

ANGELA REKSIDLER BRAGA

INDUÇÃO DA MORTE DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS POR MPTP
COMO MODELO ANIMAL DA DOENÇA DE PARKINSON: UMA ABORDAGEM
MOLECULAR E FARMACOLÓGICA

Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciências-
Farmacologia, ao Curso de Pós-Graduação em
Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Aparecida B. F.
Vital

Co-orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

CURITIBA
2008

Esta tese de Doutorado foi realizada no Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná e no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina com apoio financeiro da CAPES.

*Importante não é o que fizeram de nós,
mas o que fazemos do que fizeram de nós.*

Sartre

Para
Marcelo de Meira Santos Lima

“...E o meu lugar é esse
Ao lado seu, meu corpo inteiro
Dou o meu lugar pois o seu lugar
É o meu amor primeiro
O dia e a noite as quatro estações...”

Dois Poemas (Samuel Rosa - Lô Borges - Nando Reis)

Á Deus

Pelo sopro de Deus se dá a geada, e as largas águas se congelam. Também de umidade carrega as densas nuvens, nuvens que espargem os relâmpagos. Então elas, segundo o rumo que Ele dá, se espalham para uma e outra direção, para fazerem tudo o que lhes ordena sobre a redondeza da terra.
Jó 37, 10-12.

À Suzete Reksidler Braga

*Mãe...
São três letras apenas
As desse nome bendito:
Também o Céu tem três letras...
E nelas cabe o infinito.
Para louvar nossa mãe,
Todo o bem que se disser
Nunca há de ser tão grande
Como o bem que ela nos quer...
Palavra tão pequenina,
Bem sabem os lábios meus
Que és do tamanho do Céu
E apenas menor que Deus!*

Mário Quintana

Agradecimentos

Á Deus, que me deu vida e capacidade de realizar esta tese;

Ao Marcelo de Meira Santos Lima pelo apoio, trabalho, força, incentivo e amor;

Á minha orientadora (e amiga) Professora Doutora Maria Aparecida Barbato Frazão Vital a quem eu agradeço por todo conhecimento. Obrigada pelos seus ensinamentos científicos e filosóficos;

Á minha mãe, Suzete Reksidler Braga, obrigada por toda luta que você enfrentou por nós e que permitiu com que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Lilian e Ricardo e à minha querida avó Sophia Guzick Reksidler;

Ao meu pai, Cláudio Kirchener Braga: *“E perto do fim não pude mais encontrar e o amor ainda estava lá...”* John - Canção pra você viver mais.

A Irene e João de Meira Santos Lima e as famílias Reksidler Bora e Selke;

Aos meus queridos amigos Patrícia Dombrowski, Evellyn Wietzikoski, Eduardo Manoel Pereira, Jackson Rapkiewicz, Sílvia Genari, Evelise Fernandes Pietrovski, Lucélia Santos, Inara Raupp, Yanna Rattmann, Edmar Miyoshi, Fernanda Lapa, Alessandra Lemes, Adriano Zager, Célia Santos de Lima, Marilde Aires Costa e todos os amigos da pós-graduação do departamento de Farmacologia da UFPR;

Aos meus Professores do Depto. de Farmacologia, em especial ao meu co-orientador Prof. Dr. Roberto Andreatini e aos Profs. Dr. Cláudio Da Cunha e Dr. Herbert Trebien pelas dicas e conversas animadoras;

Aos grandes amigos Érica Hartmann, Guilherme Borges, Luciana Ribeiro e Daniel Viegas. Agradeço a vocês que sempre estiveram ao meu lado e que compartilharam comigo muitos momentos importantes da minha vida, obrigada pela paciência, amizade e força. Amo vocês!

Ao departamento de Psicobiologia da UNIFESP e em especial aos Professores Dr. Sergio Tufik e Dra. Monica Levy Andersen;

Aos animais utilizados nos experimentos;

Á Universidade Federal do Paraná, instituição na qual há 10 anos eu ingressei, me dando uma formação profissional e humana pela qual sou imensamente agradecida;

A CAPES pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Doença de Parkinson	14
1.2. Características clínicas da DP	15
1.3. Características neuroquímicas e neuropatológicas da DP	16
1.4. Etiologia da DP	19
1.4.1. Estresse oxidativo e DP	22
1.4.2. Apoptose e a mitocôndria na morte neuronal da DP	24
1.4.3. Envolvimento do NO na patogênese da DP	25
1.5. Modelos animais da DP	29
1.5.1. MPTP	30
1.6. Potenciais tratamentos farmacológicos da DP	31
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivos específicos	36
3. MATERIAS E MÉTODOS	37
3.1. Animais	37
3.2. Drogas	38
3.3. Cirurgia estereotáxica e injeções intranigrais	39
3.4. Observações comportamentais	41
3.4.1. Campo aberto	41
3.5. Ensaios Moleculares	42
3.5.1. Extração de proteínas	42
3.5.2. Determinação da expressão da proteína TH por <i>Western Blotting</i>	43
3.5.3. Análise densitométrica	44
3.5.4. Imuno-histoquímica para TH dos neurônios da SNpc	44
3.5.5. Imunofluorescência para TH, Bcl2, NOSn	46
3.5.6. Determinação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA	47
3.6. Análise estatística	49

4. RESULTADOS	50
4.1. Experimento 1 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares mediados pelo 7-NI no modelo animal da DP induzido por MPTP em ratos	50
4.1.1. Parâmetros motores	50
4.1.1.1. Efeitos da inibição da NOSn mediada por 7-NI nos parâmetros motores de ratos tratados com MPTP	50
4.1.1.2. Efeitos da inibição da da MAO-B mediada pela Pargilina nos parâmetros motores de ratos tratados com MPTP	53
4.1.2. Efeitos da inibição da NOSn mediada por 7-NI nos parâmetros moleculares de ratos tratados com MPTP	56
4.1.2.1. Determinação da expressão nigral de moléculas envolvidas com a resposta neuroprotetora induzida pelo 7-NI	56
4.2. Experimento 2 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares da infusão intranigral de L-DOPA no modelo da DP induzido por MPTP em ratos	65
4.2.1. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA nos parâmetros motores de ratos tratados com MPTP	66
4.2.2. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA na avaliação por imuno-histoquímica para TH em ratos tratados com MPTP	68
4.2.3. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA na expressão da proteína TH em ratos tratados com MPTP	70
4.2.4. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA na determinação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA em ratos tratados com MPTP	72
4.3. Experimento 3 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares de administrações repetidas de MPTP intranigral em ratos	74
4.3.1. Efeitos das administrações repetidas de MPTP intranigral em ratos nos parâmetros motores	75
4.3.2 Efeitos das administrações repetidas de MPTP intranigral na avaliação por imuno-histoquímica para TH em ratos	83

4.3.3.Efeitos das administrações repetidas de MPTP intranigral na expressão da proteína TH em ratos	86
5. DISCUSSÃO	88
5.1. Experimento 1 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares mediados pelo 7-NI no modelo animal da DP induzido por MPTP em ratos	88
5.2. Experimento 2 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares da infusão intranigral de L-DOPA no modelo da DP induzido por MPTP em ratos	92
5.3. Experimento 3 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares de administrações repetidas de MPTP intranigral em ratos	99
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
7. CONCLUSÕES	109
8. REFERÊNCIAS	110
9. ANEXOS	122

ABSTRACT

The main objective of the present thesis was to investigate the behavioral and molecular patterns generated by the dopaminergic neurodegeneration promoted by the animal model of Parkinson's disease (PD) induced by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). The first experiment demonstrated that the inhibition of neuronal nitric oxide (nNOS) promoted by 7-nitroindazol (7-NI) generated an increased expression in the anti-apoptotic protein Bcl2. In the following experiment, the intranigral infusion of 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (10 μ M) showed a 30.5% reduction of dopaminergic neurons. Concomitant administration of MPTP and L-DOPA evoked a partial restorative effect in motor behavior in comparison to MPTP alone. Neurochemical study showed an important reduction of dopamine (DA) levels in the MPTP and L-DOPA groups. In the last set of experiments we resorted to exam the neuroplasticity properties of the nigrostriatal dopaminergic neurons after repeated MPTP administrations. A persistent locomotor deficit was produced after the 2nd infusion, remaining until the last time-point. Tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive neurons were reduced in 50% 1 day after the 1st infusion and the neuronal loss remained constant even all periods of analyses. In parallel, (TH) protein expression in the substantia nigra pars compacta (SNpc) revealed to be a sensitive target for MPTP, once it was found to be down-regulated immediately after the 1st MPTP exposure until the last time-point. In conclusion, the current findings indicated neuroprotective effects mediated by 7-NI which could be related to both: inhibition of nNOS and MAO-B. Additionally, L-DOPA was capable to promote dopaminergic neurotoxicity similar to MPTP. Finally, the data regarding repeated MPTP administrations revealed important features concerning the neuronal plasticity of the dopaminergic neurons present in the nigrostriatal pathway.

RESUMO

O principal objetivo desta tese foi investigar os padrões comportamentais e moleculares gerados pela neurodegeneração dopaminérgica produzida pelo modelo animal da doença de Parkinson (DP) induzido pela neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP). O primeiro experimento demonstrou que a inibição farmacológica da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOSn) pelo 7-nitroindazol (7-NI) acarretou num aumento de expressão da molécula anti-apoptótica Bcl2. No segundo experimento a infusão intranigral de 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (10 μ M) levou a uma redução de 30,5% dos neurônios dopaminérgicos. Administrações concomitantes de MPTP e L-DOPA desencadearam um efeito restaurador parcial sobre o comportamento motor, em comparação ao grupo tratado apenas com MPTP. Análises neuroquímicas mostraram que os níveis de dopamina (DA) foram reduzidos tanto pelo tratamento com MPTP quanto por L-DOPA. No terceiro experimento, examinaram-se as propriedades de neuroplasticidade dos neurônios dopaminérgicos após administrações intranigrais repetidas de MPTP. Um persistente prejuízo locomotor foi produzido logo após a segunda infusão, permanecendo até o último período analisado. Os neurônios dopaminérgicos foram reduzidos em 50% logo após a primeira infusão, permanecendo essa redução constante em todos os períodos de observação. Em paralelo, a expressão nigral da proteína tirosina hidroxilase (TH) revelou-se como um alvo sensível para o MPTP, uma vez que ela encontrou-se reduzida imediatamente após o primeiro período de exposição ao MPTP, permanecendo esse resultado nos períodos subseqüentes. Em conclusão, os resultados aqui apresentados indicam efeitos neuroprotetores mediados pelo 7-NI que podem ser relacionados com: inibição da NOSn e da MAO-B. Além disso, mostrou-se que a L-DOPA foi capaz de promover neurotoxicidade dopaminérgica de maneira similar ao MPTP. Finalmente, os resultados envolvendo o novo protocolo proposto, com repetidas administrações intranigrais de MPTP, revelou importantes características sobre a plasticidade neuronal dos neurônios dopaminérgicos presentes na via nigroestriatal.

Lista de Abreviaturas

AIE - antiinflamatório esteroideal
AINE - antiinflamatório não-esteroideal
ATP - adenosina trifosfato
ATV - área tegmental ventral
5-HT - serotonina
COX - ciclooxigenase
COMT - catecol-O-metiltransferase
Cyto c - citocromo c
DA - dopamina
DAT - transportador de dopamina
DOPAC - 3,4-dihidroxifenilacético
DP - Doença de Parkinson
GABA - ácido γ -aminobutírico
GSH - glutathione
HVA - ácido homovanílico
L-DOPA - 3,4-dihidroxifenilalanina
LPS - lipopolissacarídeo
MAO-B - monoamino oxidase-B
METH - Metanfetamina
MPDP⁺ - 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridium
MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridina
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MPT - Permeabilidade mitocondrial transicional
NO - óxido nítrico
NOS - óxido nítrico sintase
cNOS - NOS constitutiva
eNOS - NOS endotelial
iNOS - NOS induzida
nNOS - NOS neuronal
PG - prostaglandinas
ROS - espécies reativas de oxigênio
RNS - espécies reativas de nitrogênio
6 - OHDA - 6 - hidroxidopamina
7-NI - 7-nitroindazol
SN - Substância negra
SNC - sistema nervoso central
SNpc - Substância negra parte compacta
TH - tirosina hidroxilase
TH-ir - TH-imunoreativos

1. INTRODUÇÃO

1.1. DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é uma patologia neurodegenerativa progressiva com prevalência aproximada de um caso em cada 300 (Schapira *et al.*, 2006). A média de idade para ocorrência da DP é de 55 anos, sendo que o seu risco de desenvolvimento aumenta em cinco vezes por volta dos 70 anos de idade (Hald e Lotharius, 2005). A DP é principalmente caracterizada pela ocorrência de distúrbios de movimento, balanço e alterações do controle motor fino (Gomes *et al.*, 2008), todos com características incapacitantes. Os sinais clínicos mais evidentes são caracterizados por anormalidades motoras irreversíveis que incluem rigidez muscular, tremor em repouso, fraqueza muscular, instabilidade postural e escassez de movimentos voluntários (Schapira *et al.*, 2006). Esses sinais resultam da perda de neurônios dopaminérgicos de uma região em particular, localizada no mesencéfalo, denominada substância negra pars compacta (SNpc). A redução na densidade neuronal dessa população celular gera uma diminuição na projeção de fibras dopaminérgicas que aferentam o estriado dorsal causando por sua vez, uma conseqüente redução dos níveis de dopamina (DA) nessa estrutura dos núcleos da base.

Além dos sinais motores, também podem compor os achados clínicos a presença de disfunções autonômicas e distúrbios psico-orgânicos (Birkmayer e Riederer, 1985; Valldeoriola *et al.*, 1997; Calne, 2001) além do desencadeamento de inúmeros distúrbios de sono (Askenasy, 2005; Rye, 2006). Os sinais clínicos, presentes na DP, foram inicialmente descritos em 1817 por James Parkinson (médico inglês e membro do colégio real de

cirurgias) na sua clássica publicação: “Ensaio sobre a paralisia agitante” (Dauer e Przedborski, 2003; Toulouse e Sullivan, 2008). Porém, apenas em 1920, Jean-Martin Charcot reconheceu o pioneirismo de James Parkinson na descrição da paralisia agitante denominando-a com o nome de seu descobridor (Burch e Sheerin, 2005). Após quase dois séculos de sua descrição inicial a DP ainda é uma doença de patogênese pouco compreendida (Shimohama, 2003), sendo seu tratamento basicamente sintomático (Lev *et al.*, 2003).

1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA DP

Uma variedade de sinais clínicos podem acompanhar a DP trazendo assim um grau elevado de complexidade de diagnóstico. Esses sintomas geralmente são acompanhados por anomalias posturais, sintomas vegetativos (que incluem aumento de salivação, seborréia, constipação, vermelhidão e sudorese) e distúrbios psico-orgânicos como depressão, apatia, declínio cognitivo e demência (Maguire-Zeiss *et al.*, 2005; Schapira *et al.*, 2006).

Paralelamente, os pacientes se tornam passivos ou retraídos, manifestando falta de iniciativa, respondem demoradamente a questões, e os processos cognitivos são vagarosos (“bradifrenia”) (Dauer e Przedborski, 2003; Schapira *et al.*, 2006). Usualmente existe uma assimetria nos sinais e sintomas motores extrapiramidais o que pode ser explicado pela perda neuronal que ocorre de maneira não-homogênea nos hemisférios encefálicos (Gelb *et al.*, 1999).

1.3. CARACTERÍSTICAS NEUROQUÍMICAS E NEUROPATOLÓGICAS DA DP

Os sinais patológicos culminam com a perda de neurônios dopaminérgicos então residentes na SN (Orr, 2002). Esse evento de morte neuronal é desencadeado por inúmeros fatores que compõe um cenário ainda pouco compreendido. Porém um dos achados fisiopatológicos mais freqüentes na DP é a presença de inclusões citoplasmáticas nucleares chamadas de corpúsculos de Lewy (Togo *et al.*, 2001, Dauer e Przedborski, 2003), formados principalmente pela proteína neural chamada α -sinucleína (ver Figura 1) (Koo *et al.*, 2008). Esses agregados protéicos acumulam-se nos neurônios, onde ao ultrapassar um determinado limiar acarretam neurotoxicidade com conseqüente morte neuronal e concomitante redução da aferência dopaminérgica para o estriado.

A via dopaminérgica nigroestriatal é composta por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putâmen, ou corpo estriado conforme ilustra a Figura 1 (Przedborski, 2005).

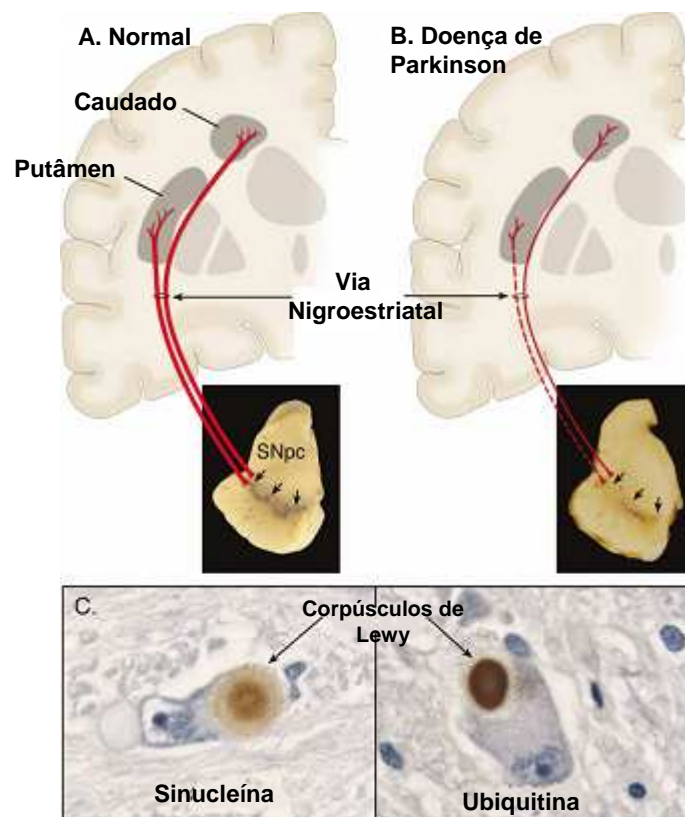


Figura 1: Representação esquemática da via nigroestriatal normal (A) e na DP (B). Em C imunohistoquímica marcando inclusões intracelulares os chamados corpúsculos de Lewy em neurônios dopaminérgicos na SNpc. Adaptado de: Dauer e Przedorski (2003).

No estriado há redução nos níveis de DA, e como resultado disso, também nos níveis de seus metabólitos ácido homovanílico (HVA) e 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Lang e Lozano, 1998; Mizuno, 1999). Também se observa a redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e DOPA-descarboxilase (Gerlach e Riederer, 1996). De maneira geral, pode-se verificar a presença de anormalidades histológicas também encontradas em outros sistemas celulares como no *locus coeruleus*, por exemplo (Dauer e Przedborski, 2003).

Sob o aspecto neuroquímico, observa-se que a degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal leva a uma intensa redução dos

níveis de DA no estriado, bem como em outros núcleos da base (Gerlach e Riederer, 1996). Esses núcleos ou gânglios da base compõem um grupo de núcleos subcorticais que possuem como função primordial o controle dos movimentos voluntários; são eles: estriado (caudado e putâmen), globo pálido (interno e externo), núcleo subtalâmico, e SN (pars compacta e reticulata) (Burch e Sheerin, 2005).

Correlações entre análises clínicas e bioquímicas, mostram que os sintomas característicos da DP começam a aparecer quando aproximadamente 60% e 80% dos conteúdos de DA na SNpc e no putamen, respectivamente, são perdidos (Dauer e Przedborski, 2003).

Em pacientes parkinsonianos, além do decréscimo de DA na via nigroestriatal, também pode ocorrer degeneração de neurônios dopaminérgicos na área tegmental ventral (ATV), redução da noradrenalina nos neurônios do *locus coeruleus*, perda de serotonina no núcleo da rafe e redução de acetilcolina no núcleo basal de Meynert (Agid *et al.*, 1990). Ocorre também uma diminuição na atividade da enzima glutamato descarboxilase, enzima responsável pela biossíntese do ácido γ -aminobutírico (GABA), que pode ser consequência da neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (Gerlach e Riederer, 1996).

1.4. ETIOLOGIA DA DP

A DP, assim como outras doenças neurodegenerativas não possui etiologia conhecida.

Porém, em raras condições observa-se correlação entre a ocorrência da doença e mutações em um pequeno número de genes, o que constitui uma forma familiar da doença que geralmente acomete os indivíduos ainda na juventude (Vila, 2004; Hald e Lotharius, 2005). De 5 a 10% dos casos da DP observam-se ligações entre a ocorrência da doença e mutações em um pequeno número de genes (forma familiar) (Vila e Przedborski, 2004; Hald e Lotharius, 2005).

Mutações na α -sinucleína na forma familiar da DP são herdadas de maneira autossômica dominante, e as formas mutantes desta proteína apresentam uma função tóxica nas células dopaminérgicas (Dawson e Dawson, 2003; Eriksen *et al.*, 2005). Uma supressão completa da proteína α -sinucleína não resulta no desenvolvimento do fenótipo da DP (Eriksen *et al.*, 2005). A redução da expressão da α -sinucleína foi benéfica, pois preveniu a neurotoxicidade dopaminérgica mediada pelos altos níveis desta proteína e também preveniu a neurotoxicidade pela neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongos (Dauer, 2002).

Tem-se demonstrado que a forma monogênica do parkinsonismo causado por mutações da *parkina* (herdada de maneira recessiva) representa uma importante causa do parkinsonismo precoce sem histórico familiar, bem como na DP esporádica, especialmente antes dos 30 anos de idade (Sing e Dikshit, 2007). Entretanto, mesmo quando o início ocorre entre idades de 30 e 45 anos, a *parkina* ainda é responsável por 8% dos casos isolados de

parkinsonismo. O fenótipo gerado pela *parkina* é variável, porém não pode ser distinguido de casos não derivados dela (Periquet *et al.*, 2003).

Apesar das diferentes características clínicas e patológicas das formas de manifestação da DP familiar e idiopática, ambas apresentam as mesmas anormalidades neuroquímicas, principalmente quanto à depleção do conteúdo de DA mesencefálica (Przedborski, 2005).

Teoricamente, a neurodegeneração progressiva pode ser provocada por uma exposição crônica a neurotoxinas dopaminérgicas, ou apenas por uma breve exposição, que de alguma maneira já seria capaz de levar ao início de uma cascata de eventos deletérios (Dauer e Przedborski, 2003). O fato de que um grupo de jovens intoxicados com a substância MPTP desenvolveu uma síndrome semelhante à DP (Langston, 1983) é um exemplo de como uma toxina exógena pode mimetizar as características clínicas e patológicas da doença. Além do MPTP, alguns fatores ambientais e ocupacionais como o herbicida paraquat, que é similar estruturalmente ao 1-metil-4-fenilpiridina (MPP⁺)¹, bem como o inseticida rotenona que apresenta toxicidade mitocondrial semelhante ao MPP⁺, são largamente utilizados e distribuídos no meio-ambiente, sendo eles associados com um aumento da prevalência da doença (Gorell *et al.*, 2004). Outra possibilidade para a causa, além das hipóteses genéticas e ambientais, é a neurodegeneração causada por toxinas endógenas, que podem ser originadas em virtude de erros em algumas vias metabólicas (Goralski e Renton, 2004).

Dados originados nas últimas décadas por estudos clínicos, autópsias e experimentos *in vivo* e *in vitro* com modelos animais, tem possibilitado algum

¹ MPP⁺ é o metabólito ativo do MPTP.

entendimento sobre a patogênese da doença. As hipóteses incluem: defeitos conformacionais nas estruturas de proteínas citoplasmáticas e disfunções mitocondriais com conseqüente aumento do estresse oxidativo, resultando na morte neuronal (Dauer e Przedborski, 2003; Singh e Dikshi, 2007). Mas, existem outros fatores a serem considerados como a excitotoxicidade, neuroinflamação e eventos apoptóticos (Singh e Dikshi, 2007).

O que parece ser mais plausível é um envolvimento de todos os fatores que podem interagir e provocar a morte de neurônios da SNpc (Przedborski, 2005). Portanto, sugere-se que a degeneração neuronal não resulta apenas da ação de um único fator deletério, mas da convergência de diversos fatores patogênicos como ilustrados na Figura 2 (Esposito *et al.*, 2007).

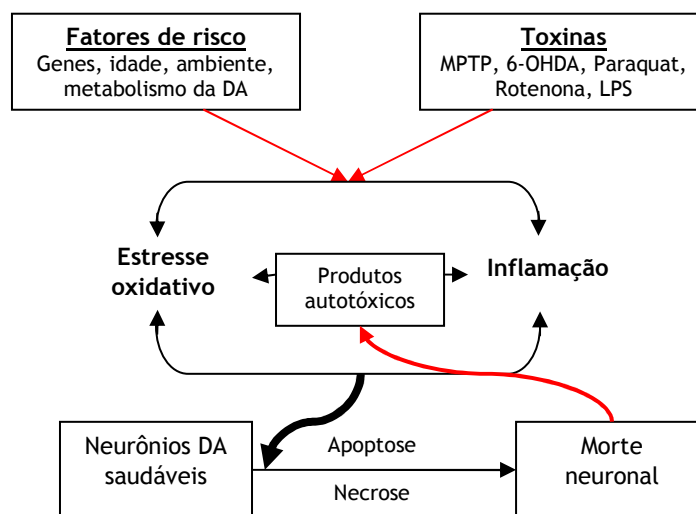


Figura 2. Interação sinérgica de mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos na DP. 6-OHDA - 6 hidroxidopamina, LPS - lipopolissacarídeo. (Adaptado de: Esposito *et al.*, 2007).

1.4.1. Estresse oxidativo e DP

Classicamente o estresse oxidativo é descrito como um desequilíbrio entre a formação e a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Barnham *et al.*, 2004). As ROS (incluindo os radicais superóxido - $O_2^{\bullet -}$ e hidroxil - OH^{\bullet} e peróxido de hidrogênio - H_2O_2) e as RNS (incluindo o peróxido nitrito - $ONOO^-$, que é o RNS com maior potencial reativo) são as principais causas do estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC).

As ROS são produzidas por diferentes vias, incluindo a interação direta com íons metálicos e espécies oxidantes via reação de Fenton ou por via indireta envolvendo a ativação de enzimas como fosfolipases e óxido nítrico sintase (NOS) (Barnham *et al.*, 2004; Calabrese *et al.*, 2007). O SNC é especialmente sensível a eventos geradores de estresse oxidativo em razão das suas características fisiológicas e anatômicas. O encéfalo possui, em sua maioria, vasos sanguíneos de pequeno calibre que por sua vez são menos permeáveis a moléculas, em comparação a outros endotélios vasculares. Além disso, a presença da barreira hematoencefálica dificulta a entrada de fagócitos (Emerit *et al.*, 2003). Existe um grande número de evidências correlacionando estresse oxidativo e DP (Drechsel e Patel, 2008). Foram detectados níveis reduzidos de glutathiona (GSH), que constitui o principal sistema redox de controle do estresse oxidativo, em amostras *post mortem* da SN de pacientes

parkinsonianos quando comparados às amostras controles (Emerit *et al.*, 2003).

A disfunção mitocondrial tem sido amplamente relacionada com a patogênese da DP (Abou-Sleiman *et al.*, 2006). Aproximadamente 100% do oxigênio molecular é consumido pela respiração mitocondrial formando como subprodutos espécies oxidantes incluindo: $-O_2^{\bullet}$, $-OH^{\bullet}$ e $-H_2O_2$ (Dauer e Przedborski, 2003). Neste sentido, a inibição do complexo I aumenta a produção de superóxidos, que formam radicais $-OH^{\bullet}$ ou reagem com o óxido nítrico (NO) formando peroxinitritos; estes causam danos celulares por reagirem com ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Dauer e Przedborski, 2003).

Neurônios dopaminérgicos podem favorecer o ambiente para a produção de ROS. A metabolização da DA produz $-O_2^{\bullet}$, $-OH^{\bullet}$ e $-H_2O_2$, e a auto-oxidação da DA produz DA-quinona, molécula esta que danifica proteínas reagindo com resíduos de cisteína (Dauer e Przedborski, 2003). A deficiência energética relacionada à mitocôndria pode levar ao rompimento de vesículas que armazenam DA, aumentando sua concentração no citossol ocasionando danos em macromoléculas (Dauer e Przedborski, 2003). Além disso, as ROS e RNS estão envolvidas em processos apoptóticos e em mecanismos de excitotoxicidade (Kokoszka *et al.*, 2001).

1.4.2. Apoptose e a mitocôndria na morte neuronal da DP

Apoptose dos neurônios dopaminérgicos nigrais é um evento envolvido no processo de neurodegeneração na DP (Battisti *et al.*, 2008). Essa hipótese foi demonstrada em estudos de modelos animais e de modelos *in vitro* (Novikova *et al.*, 2006; Mladenovic *et al.*, 2004).

O processo apoptótico é causado por uma cascata de eventos na qual a família de cisteína proteases conhecida como caspases² levam a quebra de múltiplos substratos, com especificidade para o ácido aspártico (Lev *et al.*, 2003; Eberhardt e Schulz, 2003). A morte apoptótica é caracterizada pela expressão de genes (a maior parte oncogenes), que aumentam o processo apoptótico (*bax*, *bcl-x*) e outros que inibem a morte celular (por exemplo: *bcl-2*, *bcl-xL*) (Lev *et al.*, 2003).

Existem duas vias que relacionam a contribuição mitocondrial com a morte celular. A primeira via envolve a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) e conseqüente liberação do citocromo c (cyto c); isso ocorre quando são ativadas as proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax e/ou Bak) (Green, 2005; Sas *et al.*, 2007). A segunda via de morte celular é iniciada por condições que levam a permeabilidade mitocondrial transicional (MPT), definido como um aumento não-específico da permeabilidade da membrana mitocondrial interna (Halestrap, 2002, Sas *et al.*, 2007), levando ao inchaço e ruptura da membrana externa (Green, 2005).

² Caspases (cysteinyll **asp**artate-specific protein**ase**) formam uma família de cisteína proteases que apresentam como substrato específico, o ácido aspártico.

Achados clínicos, estudos com modelos experimentais da DP, bem como estudos *in vitro* de várias linhagens celulares demonstram o envolvimento da apoptose na neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos (Singh e Dikshit, 2007).

1.4.3. Envolvimento do NO na patogênese da DP

Importantes evidências têm demonstrado o envolvimento do NO na degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal (Duncan e Heales, 2005; Zhang *et al.*, 2006). O NO é um neurotransmissor que em certas condições pode atuar como radical livre de vida curta (1-5 s), altamente permeável às membranas biológicas por ser uma molécula gasosa, tendo sido implicado em várias condições fisiológicas (processos de sinalização e comunicação celular em uma variedade de sistemas) e patológicas, incluindo a morte celular (Iravani *et al.*, 2002; Martinez-Ruiz e Lamas, 2004; Calabrese *et al.*, 2007).

O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pela enzima NOS que apresenta-se em três formas distintas (isoenzimas) sintetizadoras de NO: a forma neuronal (NOS_n; tipo I), a forma induzida (NOS_i; tipo II), que é produzida em grande quantidade pela micróglia ativada e macrófagos e a forma endotelial (NOS_e; tipo III). O encéfalo expressa as três isoformas da enzima NOS, e embora cada isoforma possa desempenhar um discreto papel fisiológico, o NO gerado pode atuar tanto em processos fisiológicos como patológicos no SNC (Duncan e Heales, 2005). Os níveis de NOS_i no SNC são baixos, mas essa isoforma pode ser induzida por astrócitos ou por células microgliais por eventos como inflamação, infecção viral ou trauma (Calabrese *et al.*, 2007).

A NOSn e a NOSe são enzimas cálcio/calmodulina-dependentes constitutivas (Bredt *et al.*, 1991), enquanto a expressão da NOSi é cálcio/calmodulina independente e requer estimulação apropriada por LPS e/ou citocinas (Heneka *et al.*, 2000). A ativação da NOSn e da NOSe produz níveis relativamente baixos de NO por curtos períodos de tempo, enquanto a indução da NOSi catalisa altos níveis de NO por longos períodos de tempo (Nathan e Xie, 1994, Calabrese *et al.*, 2007). No SNC, a NOSn é responsável pela maior produção de NO (Mayer e Hemmens, 1997). Há evidências de que essa molécula está associada com o processo de excitotoxicidade, danos ao DNA e modificações de proteínas, os quais podem promover mecanismos patogênicos envolvidos em processos neurodegenerativos (Zhang *et al.*, 2006).

Sob condições de estresse oxidativo, o NO reage com o ânion $O_2^{\bullet -}$ para formar $ONOO^-$, o qual por sua vez leva à produção de radicais OH^\bullet que são altamente tóxicos (Iravani *et al.*, 2002). Na DP e em outras doenças neurodegenerativas, existem evidências de que o alvo do NO e de seus metabólitos seja a mitocôndria, onde essas espécies levam à inibição da cadeia respiratória (Healrs *et al.*, 1999). De acordo com Giulivi e colaboradores (2006), o NO é uma molécula sinalizadora que regula o consumo de oxigênio pela mitocôndria bem como a produção de ROS.

O estudo do efeito protetor ou lesivo do NO sobre neurônios tem sido amplamente debatido (Calabrese *et al.*, 2007). Em diversas doenças neurodegenerativas como a esclerose lateral amiotrófica e a DP, o NO em altas concentrações leva a morte celular por apoptose (Singh e Dikshit, 2007). Por outro lado, concentrações fisiológicas do NO suprimem eventos apoptóticos

como aqueles induzidos por hipóxia, danos teciduais gerados por irradiação e falência hepática na sepse (Singh e Dikshit, 2007).

O NO e as RNS contribuem para o estresse oxidativo e eventos pró-apoptóticos que levam a morte de neurônios dopaminérgicos. Entre os efeitos citotóxicos do NO e/ou do ONOO^- estão os danos ao DNA, acúmulo do supressor tumoral e fator de transcrição nuclear p53 (p53)³, além da indução da liberação da cyto c, ativação de caspases e modulação do efeito da ciclooxigenase-2 (COX-2) no SNC (Chung *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2001; Singh e Dikshit, 2007; Calabrese *et al.*, 2007). Portanto o NO tem um papel crucial no balanço entre a proliferação e a morte celular. A morte celular normalmente ocorre via apoptose, entretanto quaisquer alterações na homeostase dos mecanismos fisiológicos de morte celular podem contribuir para a gênese de diversas patologias neurodegenerativas (Singh e Dikshit, 2007).

Embora não se saiba o exato mecanismo de contribuição do NO para a DP algumas evidências tem sido descritas na literatura. Estudos mostraram que houve um aumento da expressão da NOSi em modelos experimentais de parkinsonismo induzidos por 6-OHDA e LPS (Barthwal *et al.*, 2001; Gatto *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2005). Além disso, também foi reportado o aumento da expressão da NOSn e da formação de ONOO^- em células polimorfonucleares de pacientes parkinsonianos (Gatto *et al.*, 1996; Barthwal *et al.*, 1999; Gatto *et al.*, 2000).

O uso de modelos animais pôde lançar uma nova luz na questão envolvendo a relação entre morte neuronal e o papel da NOS sobre esse

³ A p53 é um modulador chave para respostas celulares ao estresse, e pode provocar apoptose em muitos tipos celulares incluindo neurônios (Culmsee e Mattson, 2005).

evento. Nesse sentido, relatos da literatura mostraram que a neurodegeneração dopaminérgica induzida por MPP⁺ pode ser atenuada pelo inibidor da NOS, 7-nitroindazol (7-NI) (Cutillas *et al.*, 1999). Essa ação do 7-NI possivelmente está relacionada com a inibição da NOSn ou então através da sua atuação inibitória sobre a enzima monoamino oxidase B (MAO-B) como foi mostrado por Castagnoli e colaboradores (1997).

Corroborando esses achados experimentais, He e colaboradores (2003), demonstraram que a rotenona, substância amplamente utilizada como pesticida, e que mimetiza os sintomas comportamentais e patológicos da DP em ratos, levou a um decréscimo de 50% nos níveis de DA estriatal e aproximadamente 30% de perda de neurônios TH-imunorreativos (TH-ir). Além disso, foi verificado um aumento de 80% na atividade da NOS na SN. Esses dados apontam fortemente para o envolvimento do NO com os eventos da via apoptótica.

Não obstante, a NOS também estaria envolvida em mecanismos de neuroinflamação, que compõe outra vertente bastante importante para a morte neuronal. Foi relatado que a expressão da NOSi durante o processo neuroinflamatório teria um papel chave para a neurodegeneração encontrada na DP (McGeer *et al.*, 1988; Hunot *et al.*, 1996; Jenner, 1996). Em análises *post mortem* de encéfalos de pacientes com DP, o processo neuroinflamatório foi evidente na SN (Teismann *et al.*, 2003), coincidindo com a proliferação de micróglia super-expressando NOSi (McGeer *et al.*, 1988; Hunot *et al.*, 1996).

A possível atuação de inibidores da NOS como agentes farmacológicos neuroprotetores têm sido amplamente investigada e uma extensa variedade de

estudos que sugerem que essas drogas podem ser consideradas como uma importante ferramenta terapêutica para DP (Singh e Dikshit, 2007).

1.5. MODELOS ANIMAIS DA DP

O cenário atual ao qual se enquadram nossos conhecimentos sobre a etiologia, fisiopatologia e terapêutica da DP ainda não permitem um entendimento completo e satisfatório sobre essa doença (Shimohama, 2003). Entretanto, diversos avanços foram conquistados ao longo dos últimos 50 anos, devido a valorosas contribuições oriundas da Biologia Molecular e Celular para a Neurociência. Hoje é possível produzir inúmeras alterações moleculares e celulares nos neurônios dopaminérgicos, culminado em modificações comportamentais muito similares às encontradas em pacientes com DP. Dessa forma, utilizando-se modelos animais, é possível ampliar as formas de compreensão da doença a níveis muito detalhados, podendo-se inclusive sugerir novas formas de abordagem terapêutica a serem testadas na clínica.

Modelos animais, por definição, refletem as características da doença presente no homem, simulando as mudanças patológicas, histológicas e bioquímicas da doença, bem como seus distúrbios funcionais (Gerlach e Riederer, 1996). A DP é uma doença exclusiva da espécie humana, não se manifestando espontaneamente em animais. Esse fato indica que essa patologia é somente observada em animais (p.e. macacos ou roedores) através da administração de agentes

neurotóxicos, como a 6-OHDA, metanfetamina, rotenona ou MPTP (Gerlach e Riederer, 1996).

1.5.1. MPTP

O reconhecimento do MPTP como neurotoxina ocorreu em 1983 quando um grupo de dependentes de drogas desenvolveu um parkinsonismo grave. A síndrome foi causada pela auto-administração de um análogo de heroína sintética, que por sua vez continha como contaminante o MPTP (Langston, 1983).

O MPTP é uma substância lipossolúvel, fato que lhe confere grande capacidade de cruzar a barreira hemato-encefálica, fazendo com que esta seja neurotóxica mesmo quando administrado por via parenteral (Langston, 1983; Ballard, 1985).

Uma vez no encéfalo, a pró-toxina MPTP é oxidada a 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropirídium (MPDP⁺) pela enzima MAO-B presente nas células da glia. Após isso, esse intermediário é convertido a MPP⁺ (provavelmente por oxidação espontânea). Como a molécula do MPP⁺ é polar, ela depende de carreadores de membrana plasmática para entrar nas células. Além disso, o MPP⁺ é um substrato de alta afinidade para o transportador de dopamina (DAT), bem como para o transportador de noradrenalina e serotonina (Przedborski *et al*, 2001; Dauer e Przedborski, 2003). Uma vez dentro dos neurônios dopaminérgicos, o MPP⁺ se concentra dentro das mitocôndrias; bloqueando o complexo I da cadeia respiratória, interrompendo a transferência de elétrons para a ubiquinona. Essa perturbação aumenta a produção de ROS

e diminui a síntese de adenosina trifosfato (ATP), portanto, comprometendo o aporte energético da célula (Dauer e Przedborski, 2003).

O MPTP, quando administrado a humanos ou a primatas, desencadeia uma síndrome parkinsoniana grave e irreversível que reproduz grande parte das características da DP, incluindo tremor em repouso, rigidez muscular, movimentos vagarosos e instabilidade postural (Przedborski *et al.*, 2001). Paralelamente a essas alterações motoras, alguns autores têm mostrado em modelos animais que esta neurotoxina produz prejuízos cognitivos similares aos ocorridos na doença (Da Cunha *et al.*, 2001, 2002, 2003; Perry *et al.*, 2004; Reksidler *et al.*, 2007). A infusão intranigral bilateral de MPTP em ratos leva a uma redução de 40 - 70% dos níveis estriatais de DA, sendo que o prejuízo cognitivo encontrado relaciona esse modelo com a fase inicial da DP (Da Cunha *et al.*, 2001; Miyoshi *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2004, 2005).

1.6. POTENCIAIS TRATAMENTOS FARMACOLÓGICOS DA DP

O protocolo farmacológico da DP utiliza principalmente a politerapia como escolha padrão para o tratamento dos pacientes. As três estratégias farmacológicas que tem levado progresso à terapêutica da DP se baseiam principalmente em: terapias dopaminérgicas (levando em conta, o controle ou prevenção das complicações motoras), na identificação de drogas não-dopaminérgicas e na descoberta de compostos que modifiquem o curso da DP (Schapira *et al.*, 2006; Ravenstijn *et al.*, 2008).

A terapia de reposição de DA através do uso do precursor dopaminérgico 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) é utilizada desde a década de 60 (Ehringer e Hornykiewicz, 1960). A L-DOPA permanece até os dias atuais como a droga mais utilizada e efetiva para tratar a bradicinesia e rigidez muscular (Rajuput, 2001; Schapira *et al.*, 2006), porém, não é muito efetiva no tratamento do tremor de repouso (Deleu *et al.*, 2002).

Embora a L-DOPA seja considerada a droga mais efetiva para o controle dos sintomas motores da DP, ela também é responsável por várias complicações motoras, particularmente as discinesias (Fahn, 2005). O uso crônico da L-DOPA, especialmente em pacientes em estágios avançados da doença, leva ao desenvolvimento de complicações motoras resistentes a terapia, aumentando a instabilidade de movimentos (Bendir *et al.*, 2006). Outra característica da administração da L-DOPA é a ocorrência de variações motoras *on-off* que são flutuações do estado clínico, em que a hipocinesia e a rigidez muscular podem piorar repentinamente de poucos minutos a horas e daí novamente melhorar (Lundblad *et al.*, 2004).

O tratamento com L-DOPA tem por base repor os níveis de DA, que se encontram seriamente comprometidos devido ao grau de neurodegeneração. Porém, ainda não está claro como esse tratamento pode aumentar ou até mesmo reverter os efeitos da perda de DA (Sarre *et al.*, 1998, Kostrzewa *et al.*, 2005). Trabalhos recentes têm apresentado uma conotação diferente em relação ao então propagado papel da L-DOPA como sendo apenas uma substância benéfica aos neurônios dopaminérgicos.

Modelos de neurodegeneração *in vitro* revelaram importantes efeitos neurotóxicos desencadeados pela administração de L-DOPA, enquanto os

efeitos da ação da L-DOPA em modelos animais tem apresentado resultados controversos (Muller *et al.*, 2004). Ou seja, ainda não se sabe ao certo como esse precursor da DA age nos neurônios dopaminérgicos mantidos em condições ideais, quanto mais frente a uma situação de lesão tecidual, em que inúmeros radicais livres e citocinas pró-inflamatórias tornam o ambiente extremamente prejudicial para a sobrevivência dos neurônios.

Por outro lado, há um grande interesse em tratamentos não-dopaminérgicos para a melhora das funções motoras sem o risco das complicações associadas com a L-DOPA, sendo que já existem vários grupos de drogas que são promissoras como neuroprotetoras (Schapira *et al.*, 2006).

Diversos estudos relatam a capacidade do 7-NI, um inibidor da NOS relativamente seletivo para a NOSn (Gomes e Bel, 2003), de impedir os danos nigroestriatais causados por MPTP (Royland *et al.*, 1999). O 7-NI têm rápido acesso ao encéfalo, onde seu mecanismo de ação tem sido relacionado à inibição da NOSn e da atividade da MAO-B, de forma reversível (Calabrese *et al.*, 2007). A inibição da produção de NO poderia prevenir os danos mitocondriais causados pelo próprio NO e/ou seus derivados peroxinitritos; e o bloqueio do metabolismo do MPTP dependente da MAO-B poderia impedir a produção de MPP⁺ e com isso prevenir os danos da fosforilação oxidativa mitocondrial (Chan *et al.*, 1993). Existem vários relatos na literatura demonstrando a ação neuroprotetora de inibidores da MAO-B em diversos modelos da DP (Langston *et al.*, 1984; Jenner, 2004; Watanabe *et al.*, 2004; Schapira *et al.*, 2006). O tratamento de primatas com a pargilina, uma droga inibidora da MAO-B, foi capaz de prevenir os efeitos neurotóxicos do MPTP (Langston *et al.*, 1984).

Em adição, evidências experimentais demonstram que a inibição da resposta neuroinflamatória, com o uso de drogas antiinflamatórias, pode ser uma estratégia neuroprotetora, havendo atenuação da degeneração de neurônios dopaminérgicos, observada experimentalmente (Gao *et al.*, 2003). A dexametasona, um antiinflamatório esteroide (AIE), tem sido descrita como uma droga que possui atividade de inibir parcialmente a reação microglial, levando a um decréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias e NO, o que resulta numa atenuação da lesão gerada por MPTP (Kurkowska-Jastrzebska *et al.*, 1999). No entanto, há evidências contrárias ao possível efeito neuroprotetor supostamente conferido à dexametasona no mesmo modelo animal (Aubin *et al.*, 1998). Uma eventual terapia a longo prazo, utilizando AIEs, tornar-se-ia limitada levando-se em conta os efeitos colaterais (principalmente imunossupressão) dessa classe de drogas.

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) como o salicilato de sódio (inibidor não-seletivo COX), demonstraram atenuar significativamente a depleção dopaminérgica induzida por MPP⁺ em camundongos, sendo este um efeito independente de prostaglandinas, e sim associado a inativação de radicais hidroxil (Sairam *et al.*, 2003). Além disso, sugere-se que inibidores da COX-2 bloqueiam a degeneração do conteúdo de DA dos neurônios induzida por MPTP (Teismann e Ferger, 2001, Tesimann *et al.*, 2003).

Estudos epidemiológicos sugerem a existência de uma correlação entre o uso de AINEs e a redução na incidência de casos de doenças

neurodegenerativas tais como a doença de Alzheimer e a DP (McGeer e McGeer, 2001; Chen *et al.*, 2003). Neste sentido, vários estudos têm demonstrado que o pré-tratamento com AINEs, que inibem a atividade da COX-2, levam a neuroproteção frente à toxicidade induzida pelo MPTP (Przybylkowski *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2006; Reksidler *et al.*, 2007). Isso demonstra a magnitude de importância da função da COX-2 para o processo de neurodegeneração induzido por MPTP.

Substâncias que alteram o curso da morte neuronal constituem o mais importante e promissor alvo de investigação farmacológica para o tratamento da DP bem como de outras doenças neurodegenerativas. Assim, a busca pelo entendimento de como pode ocorrer a recuperação de neurônios dopaminérgicos, através do uso de ferramentas farmacológicas, pode trazer um alento quanto à melhora dos sinais e sintomas, da qualidade e expectativa de vida desses pacientes acometidos pela DP.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi investigar os padrões moleculares e comportamentais gerados pela neurodegeneração dopaminérgica no modelo animal da DP induzida por MPTP e seus possíveis tratamentos farmacológicos.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ▶ Examinar a existência de um possível efeito neuroprotetor mediado pelo 7-NI e pargilina, bem como as possíveis contribuições das moléculas Bcl2 e NOSn para o dano neuronal mediado por MPTP em ratos.

- ▶ Verificar se a administração intranigral de L-DOPA poderia resultar em neurotoxicidade ou neuroproteção dopaminérgica.

- ▶ Estudar o efeito de repetidos insultos neurotóxicos, produzidos pelo MPTP, numa tentativa de gerar um modelo de neurodegeneração progressiva.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os animais utilizados foram ratos Wistar machos, de três meses de idade, provenientes do Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (CEDEME) (UNIFESP), pesando cerca de 260 a 300g, mantidos em sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo claro-escuro de 12 horas, sendo as luzes acessas às 7 horas e com água e comida à vontade.

Todos os cuidados foram tomados no intuito de minimizar o número de animais utilizados ao longo dos experimentos sem, no entanto, comprometer a análise estatística dos resultados. Além disso, esforços máximos foram tomados no intuito de reduzir eventuais desconfortos causados aos animais durante os experimentos. Tais preocupações se adequam as modernas práticas bioéticas de experimentação animal que visam o bem-estar animal levando em conta três metas principais: redução, remanejamento e refinamento. Todos os experimentos contidos nesta tese seguiram as normas do Comitê de Ética em Pesquisas com Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR protocolo nº 0144 (Anexo).

3.2. DROGAS

- MPTP (Sigma Chemical Co, EUA), dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) na concentração de 100 µg/µL.
- 7-nitroindazol (7-NI) (Sigma Chemical Co., EUA), dissolvido em óleo de milho, utilizado na dose de 25 mg/kg por via i.p., 1 hora antes da infusão de MPTP.
- Pargilina (Sigma Chemical Co., EUA), dissolvida em solução salina (NaCl 0,9%), utilizado na dose de 10 mg/kg por via i.p., 1 hora antes da infusão de MPTP.
- L-DOPA (Sigma Chemical Co, EUA), dissolvida em solução de concentração 10 µM (2mg/ml) preparada com solução salina (NaCl 0,9%) e acrescido do anti-oxidante Na₂EDTA 0,01%. Injetada diretamente na SN através de cânulas guia implatadas por cirurgia estereotáxica.
- Óleo de milho i.p., 1 hora antes da infusão de MPTP.
- Solução salina (NaCl 0,9%) i.p.
- Anestésico: cetamina (90 mg/kg) e o diazepam (5,5 mg/kg), como sedativo, ambos administrados i.p.
- Anestésico local: lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor, s.c. na derme que recobre o crânio dos ratos que foram submetidos a cirurgia estereotáxica.
- Todos os animais operados receberam penicilina G (20.000 U em 0.1 mL, i.m.) imediatamente após as cirurgias.

3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E INJEÇÕES INTRANIGRAIS

Todos os procedimentos de lesão da via nigroestriatal foram realizados através de cirurgia estereotáxica para garantir a reprodutibilidade de localização das injeções das drogas na SNpc. Os animais do grupo sham foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina, sendo somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de salina estéril ou veículo. Os ratos do grupo controle não foram submetidos a cirurgia estereotáxica, mas foram retirados da gaiola moradia para manuseio durante alguns minutos pelo experimentador.

Antes da cirurgia os ratos receberam o diazepam como sedativo seguido do anestésico propriamente dito (cetamina) nas doses de 10 e 90 mg/kg i.p., respectivamente. Após profundamente anestesiados, realizou-se a tricotomia dos animais, que então foram fixados em aparelho estereotáxico (Insight Instrumentos - Riberão Preto, SP, Brasil). A desinfecção do local foi feita com solução de álcool iodado, sendo que em seguida aplicou-se anestésico local (lidocaína 0,2 mL com 2% de vasoconstritor) via s.c. na derme que recobre o crânio dos ratos. Com auxílio de um bisturi, os músculos do crânio foram afastados para a exposição dos ossos da caixa craniana, as coordenadas foram determinadas a partir do bregma (anteroposterior (AP), - 5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 8,0 mm do crânio segundo Paxinos e Watson (2005)) e em seguida foram feitas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação, permitindo a microinfusão da neurotoxina diretamente na SNpc.

Para os experimentos em que as drogas foram injetadas via cânulas seguiu-se o seguinte procedimento cirúrgico: a implantação de cânulas bilaterais que foram inseridas 2,0 mm acima da SNpc seguindo as seguintes coordenadas estereotáticas: anteroposterior (AP), - 5,0 mm do bregma; latero-lateral (LL) \pm 2,1 mm da linha média; dorsoventral (DV), - 7,8 mm do crânio segundo Paxinos e Watson (2005). As cânulas foram fixadas com acrílico odontológico. Após a secagem do acrílico os animais receberam penicilina G (20000 U em 0,1 ml) via i.m. e foram colocados em gaiolas individuais forradas com serragem e aquecidas com uma lâmpada vermelha até a total recuperação.

As microinfusões das drogas foram realizadas diretamente na SNpc ou por intermédio das cânulas guia implantadas anteriormente, com auxílio de agulhas (30 gauge) conectadas a um tubo de polietileno (1 mm de diâmetro) adaptado a uma micro-seringa de 10 μ L (Hamilton, EUA) e encaixada em uma bomba de infusão (Insight Instrumentos - Riberão Preto, SP, Brasil) com um fluxo de 0,40 μ L/min por 2,5 minutos. Após o término das microinfusões as agulhas foram mantidas nos locais por mais 2 minutos para evitar refluxo das drogas. Após os procedimentos de microinfusões diretas na SNpc, os animais foram suturados e retirados do estereotático. A seguir, os ratos foram colocados em caixas individuais aquecidas até a total recuperação e após retornam as suas gaiolas de origem. Já os animais que sofreram microinfusões de drogas através de cânulas guia foram manualmente imobilizados para a realização desse procedimento. Após o término foram encaminhados para suas gaiolas moradia.

3.4. OBSERVAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Os animais em todos os experimentos foram submetidos aos testes comportamentais após a cirurgia em tempos determinados descritos nos delineamentos experimentais, sob as mesmas condições.

3.4.1. Campo Aberto

O campo aberto é um aparelho que consiste em uma arena de metal circular com 97 centímetros de diâmetro e 32,5 centímetros de altura, pintada de branco. O chão da arena é dividido por linhas pretas em um círculo central e trapézios ao redor deste, somando um total de 19 unidades. O campo aberto foi construído de acordo com a descrição de Broadhurst (1960).

Os animais foram colocados sobre o círculo central do campo aberto e seus comportamentos foram avaliados durante 5 minutos. Essa avaliação incluiu a frequência de locomoção (entrar em uma divisão com as quatro patas), de levantar (apoio somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena), duração de imobilidade (ausência de atividade motora, paralisado completamente) e a latência (tempo que o animal leva para iniciar o movimento após ter sido colocado no círculo central da arena). Cada animal foi avaliado individualmente e o aparelho foi limpo com solução de etanol 5%.

Uma outra vertente do campo aberto foi utilizada, considerando a distância percorrida e a velocidade média de cada animal, para isso o teste foi filmado e analisado pelo software de análise de imagem (2020 Plus Tracking System – HVS Image, UK).

3.5. ENSAIOS MOLECULARES

3.5.1. Extração de proteínas

Os animais foram decapitados, em seguida seus encéfalos foram dissecados rapidamente sobre uma placa de Petri imersa em gelo seco, para a retirada bilateral da SN e/ou do estriado. Essas estruturas foram imediatamente colocadas em *ependorfs* que foram acondicionados em gelo seco, inicialmente, e depois armazenados em freezer -80°C. Após isso o tecido isolado foi homogeneizado em tampão de lise gelado (pH 7,4) contendo 50 mM de Tris-HCl, 250mM de NaCl, 1% de *nonidet* P-40 (NP-40), 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS), 0,25% de deoxicolato de sódio, 0,25% de ditioneitol (DTT), 20µM de polimetilsulfonilclorida (PMSF), além do tablete completo de inibidor de protease (Roche, Alemanha). O lisado foi então centrifugado a 12.000 x *g*, a 4°C por 40 minutos. O sobrenadante correspondeu ao extrato protéico que por sua vez foi pipetado e congelado a -80°C em alíquotas para posterior doseamento de proteínas totais. A concentração de proteínas no extrato foi determinada pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Uma solução de soro albumina bovina (1 mg/mL) foi utilizada como padrão. As leituras das absorbâncias foram feitas em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 620 nm.

3.5.2. Determinação da expressão da proteína TH por *Western Blotting*

Para o experimento de imunodeteção por *western blotting*, foi utilizada metodologia de acordo com Sambrook e colaboradores (1989). Massas iguais de proteínas totais (5 µg por linha) foram aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS 10%, utilizando-se o sistema *Mini Protean II Dual Slab Cell* (Bio-Rad, EUA). Adicionou-se o tampão de corrida e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem (60 V) e variável de miliamperagem (15 a 45 mA). Após a separação protéica deu-se início a transferência (por uma hora, 100 V, 250 mA) para membrana de nitrocelulose onde utilizou-se o sistema *Mini transblot electrophoretic transfer cell* (Bio-Rad ou GE, EUA) imerso em gelo. Após a transferência as membranas foram coradas em solução de ponceau S, para verificação da qualidade do processo. Em seguida, as membranas foram lavadas (descoradas) em tampão Tris/salina-tamponada/*Tween-20* (TBST) e bloqueadas em TBST/molico 10% por uma hora sob agitação constante. Após isso, foi realizada a incubação com o anticorpo primário adequado, diluído em TBST/molico 10% (anti-TH 1:5000, Sigma, EUA ou anti-β-tubulina 1:500, Chemicon, EUA). Em seguida foram feitas várias lavagens em TBST para a retirada do excesso de anticorpo primário, e assim se pudesse proceder com a incubação do anticorpo secundário (1:5000, GE, EUA, conjugado a uma enzima *horseradish peroxidase*) adequado por uma hora.

A visualização das bandas foi realizada através do emprego do substrato quimioluminescente ECL (Amersham, EUA ou Santa Cruz Biotechnology, EUA) e de filmes de raios-x ultra-sensíveis (Hyperfilm Amersham, EUA). Os filmes

foram expostos às membranas utilizando protocolos de tempo já previamente padronizados no laboratório de farmacologia da UFPR, sendo que todos os procedimentos se deram em sala escura. Os reagentes para revelação e fixação foram provenientes da Kodak do Brasil, e utilizados em concentrações padronizadas.

3.5.3. Análise densitométrica

As bandas foram quantificadas por análise computadorizada de imagem (com auxílio do *software ImageJ* versão 1.32j de domínio público <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) onde a densidade ótica de cada banda foi detectada. Inicialmente o sistema de análise calcula a média dos valores de densidade ótica para a região delimitada pelo operador. Esta região deve ter uma área suficiente para abrigar todas as bandas (uma de cada vez) visíveis no filme, não devendo ser alterada, quando se passa a analisar uma outra banda. O valor final de intensidade relativa foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle+salina de todos os experimentos realizados.

3.5.4. Imuno-histoquímica para TH dos neurônios da SNpc

Realizou-se o procedimento de perfusão intra-cardíaca inicialmente com salina/heparina 1% seguido de formaldeído 4% (em 0,1 M tampão fosfato pH 7,4) de ratos profundamente anestesiados com cetamina. Os encéfalos foram removidos e imersos por um período de uma semana em formaldeído 1% para completa fixação do tecido. Após isso, as amostras foram mergulhadas em solução de formaldeído 1%/sacarose 20% por 48 h para crioproteção. Em criostato procederam-se as secções coronais de 30 µm de espessura no plano

frontal coletadas entre - 4,8 mm e - 5,6 mm em relação ao bregma, correspondente a SNpc de ratos (Paxinos e Watson, 2005).

As secções foram então incubadas por 12 h a 4°C com anticorpo primário polyclonal anti-TH (1:500, Chemicon, EUA), produzido em coelhos, diluído em tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100. Diversas etapas de lavagens em tampão fosfato foram realizadas para eliminar qualquer excesso do anticorpo primário. Em seguida, procedeu-se com uma incubação por duas horas, sob agitação constante em temperatura ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), das secções com anticorpo secundário (1:200, Vector Laboratories, EUA) conjugado a uma peroxidase. Realizou-se uma nova etapa de lavagem para retirada do excesso do anticorpo secundário. As secções foram então incubadas por 30 min com um reagente apropriado para a formação do complexo avidina-biotina (Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories, EUA).

Esse complexo então pôde ser localizado através de reação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) aliado à presença de sulfato de níquel, que por sua vez possibilita maior contraste a reação. Após nova etapa com inúmeras lavagens em tampão fosfato, para retirada de excessos de DAB e sulfato de níquel, as secções finalmente foram montadas em lâminas gelatinizadas. Dois dias após a montagem as lâminas já secas foram desidratadas em concentrações ascendentes de etanol (50, 70, 90, 95 e 100%), clareadas em xilol e cobertas com lamínulas e *etellan*.

Os neurônios dopaminérgicos TH-ir foram quantificados na SNpc. Todas as determinações quantitativas foram conduzidas através de análises manuais realizadas com o auxílio do software Image-Pro Express versão 6. As contagens foram realizadas em 8 a 10 secções por animal e uma média foi

determinada para cada animal, seguindo critérios estereológicos. As áreas de interesse foram digitalizadas através de uma câmera DP71 (Olympus Optical Co, Japão) acoplada a um microscópio Olympus BX50 do departamento de Psicobiologia da Unifesp.

3.5.5. Imunofluorescência para TH, Bcl2, NOSn

A metodologia de imunofluorescência seguiu a mesma descrição mostrada no item 3.5.4., diferindo apenas quanto aos anticorpos primários e secundários utilizados. As secções de mesencéfalo foram então incubadas por 12 h a 4°C com anticorpo primário polyclonal anti-T H (1:500, Chemicon, EUA), anti-Bcl2 (1:50, Chemicon, EUA) ou anti-NOSn (1:50, Chemicon, EUA), produzido em coelhos, diluído em tampão fosfato contendo 0,3% de Triton X-100. Diversas etapas de lavagens em tampão fosfato foram realizadas para eliminar qualquer excesso do anticorpo primário. Em seguida, procedeu-se com uma incubação por duas horas, sob agitação constante em temperatura ambiente ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), das secções com anticorpo secundário (1:200, Vector Laboratories, EUA) conjugado em enzimas fluorescentes (isotiocianato de fluoresceína FITC ou rodamina). Em seguida, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e cobertas com lamínulas e fluoromount. Em seguida à montagem as lâminas foram encaminhadas para aquisição das imagens em microscópio. As áreas de interesse foram digitalizadas através de uma câmera DP71 (Olympus Optical Co, Japão) acoplada a um microscópio Olympus BX50 do departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo. Todas as etapas da reação foram realizadas em ambiente com pouca

luminosidade, sendo que as lâminas foram minimamente expostas à luz branca.

A metodologia de imunofluorescência é de natureza qualitativa, entretanto, a utilização da transformação de Fourier possibilita uma análise semi-quantitativa dos resultados. Esse método baseia-se num algoritmo ao qual é capaz de transformar a densidade ótica de uma determinada área num valor de unidade arbitrária. Essa representação é feita através de uma escala de cores para permitir uma rápida identificação (de caráter semi-quantitativo) de variações sobre a expressão das moléculas analisadas. Todas as análises foram realizadas com auxílio do *software* Image-Pro Express 6.

3.5.6. Determinação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA

Para avaliação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA, os animais foram sacrificados por decapitação e seus cérebros serão removidos para a dissecação do estriado. Para a quantificação dos níveis da DA e seus metabólitos foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Para isso, as amostras foram suspendidas com ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante. Este material foi fragmentado com sonda de ultra-som e centrifugado a 10 000 x g por 20 minutos a 4° C.

Do sobrenadante, 20 µL foram injetados em uma estação de HPLC composta por bomba LC-20AT (Shimadzu Corporation, Japão), um detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector) equipado com uma célula-guarda (ESA 5020) com um potencial de 350 mV e uma célula analítica com potencias de oxidação de 100 mv para o primeiro eletrodo e 450

mV para o segundo eletrodo. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Fusion RP C-18 (Phenomenex, EUA), dimensões 150 x 4,6 mm, partículas de 4µm, em temperatura de 25°C equipada com uma pré-coluna com dimensões de 4 x 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion-RP). Os cromatogramas da DA e de seus metabólitos, DOPAC e HVA foram integrados e analisados pelo software LC Solutions (Shimadzu Corporation, Japão).

A fase móvel utilizada para a análise era constituída de: ácido cítrico 20 g; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 40 mg; ácido octanossulfônico 200 mg; 900 mL água de miliQ; metanol 10 %; pH ajustado em 4,0; fluxo de 1,0 mL/min.

As áreas dos picos foram comparadas às áreas dos padrões externos dos mesmos neurotransmissores e metabólitos (Sigma, EUA) para sua identificação e quantificação. Os resultados foram expressos como ng das aminas analisadas por massa de tecido fresco (g).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As diferenças obtidas nos parâmetros histológicos e os dados de expressão protéica foram analisados através do método de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls. O teste de Tukey foi escolhido como *post hoc* quando indicado pela ANOVA, para a análise dos resultados comportamentais. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todos os valores foram expressos como média \pm S.E.M.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1 – Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares mediados pelo 7-NI no modelo animal da DP induzido por MPTP em ratos

4.1.1. Parâmetros motores

Delineamento experimental

Para examinar a existência de um possível efeito neuroprotetor mediado pelo 7-NI e pargilina e de investigar o envolvimento da NOSn com eventos de morte neuronal foram realizados experimentos para a determinação de parâmetros motores.

Cento e vinte animais foram distribuídos em 12 grupos: controle+veículo, controle+ salina, controle+7-NI, controle+pargilina, sham+veículo, sham+salina, sham+7-NI, sham+pargilina MPTP+veículo, MPTP+veículo, MPTP+7-NI, MPTP+pargilina. Após isso os animais foram avaliados no teste do campo aberto 24 horas e 7 dias após a cirurgia.

4.1.1.1. Efeitos da inibição da NOSn mediada por 7-NI nos parâmetros motores de ratos tratados com MPTP

Os resultados obtidos pela avaliação dos parâmetros obtidos no teste do campo aberto estão representados na Figura 3.

O parâmetro de latência para o início do movimento (Figura 3A) mostrou que grupo o MPTP+veículo apresentou um aumento significativo desse parâmetro em comparação aos grupos controle e MPTP+7NI quando avaliados 24 h após a infusão de MPTP [$F(5,55)=10,426$; $P<0,0001$]. Sete dias após a

cirurgia os grupos avaliados no campo aberto não apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si [$F(5,54)=2,119$; $P=0,07$].

Quanto ao parâmetro de frequência de locomoção analisado 24 h após a cirurgia, os animais do grupo MPTP+veículo apresentaram redução significativa desse parâmetro quando comparado aos grupos controle e MPTP+7NI [$F(5,54)=16,703$; $P<0,0001$]. Entretanto, não detectou-se nenhuma diferença estatisticamente significativa nesse mesmo parâmetro, quando realizou-se o teste 7 dias após a infusão intranigral de MPTP [$F(5,55)=2,177$; $P=0,0699$], como mostrado na Figura 3B.

Na avaliação do parâmetro frequência de levantar, a Figura 3C demonstra que 24 h após a infusão da neurotoxina, o grupo MPTP+veículo apresentou uma frequência reduzida de levantar, quando comparado aos grupos controle e MPTP+7NI. Além disso, o grupo MPTP+7NI apresentou redução na frequência de levantar quando comparado ao grupo controle [$F(5,54)=18,283$; $P<0,0001$]. Inversamente ao que foi observado 24 h, o tempo de 7 dias não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos quando avaliado o parâmetro de frequência de levantar [$F(5,53) = 1,847$; $P=0,1196$].

De maneira semelhante aos outros parâmetros examinados até então, o tempo de imobilidade (Figura 3D) mostrou que o grupo MPTP+veículo apresentou aumento significativo desse parâmetro quando comparado ao grupo MPTP+7-NI 24 horas após a cirurgia estereotáxica [$F(5,54) = 29,803$; $P<0,0001$]. Esse mesmo grupo também manifestou aumento significativo do tempo de imobilidade, que perdurou até 7 dias após a infusão de MPTP, em comparação ao grupo controle [$F(5,54) = 6,570$; $P<0,0001$].

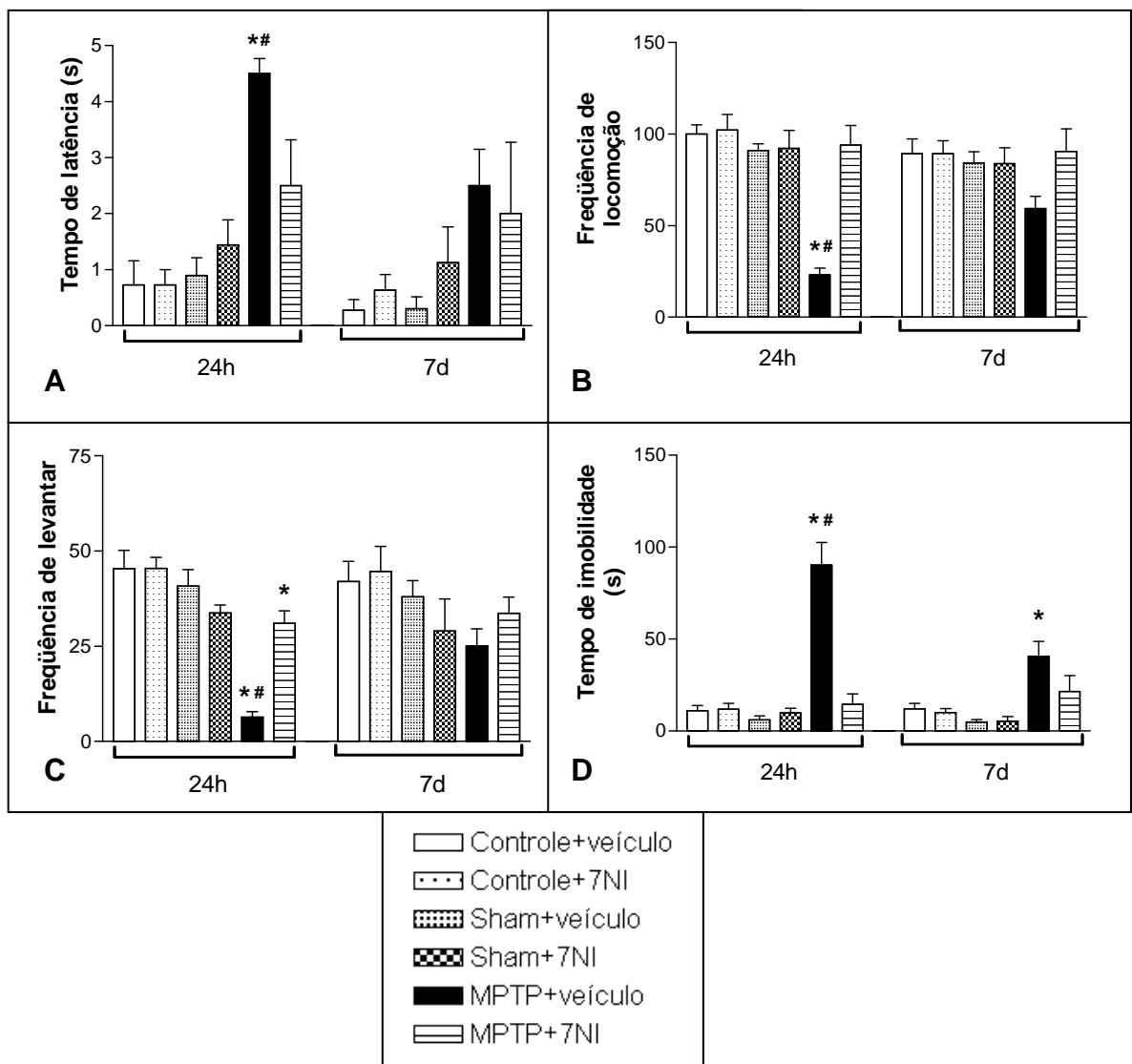


Figura 3. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de 7-NI (25 mg/kg – i.p., 1h antes da cirurgia estereotáxica) nos parâmetros motores do campo aberto, 24 h e 7 dias após a cirurgia. Em A: Latência para início do movimento, B: Frequência de locomoção, C: Frequência de levantar, D: Tempo de imobilidade. Os valores representam a média \pm S.E.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P < 0,05$ comparado ao grupo MPTP+7NI. ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. (n=10 por grupo).

4.1.1.2. Efeitos da inibição da da MAO-B mediada pela pargilina nos parâmetros motores de ratos tratados com MPTP

Baseado nos resultados anteriores, foi possível verificar a existência de um efeito possível neuroprotetor mediado pela inibição da enzima NOSn, através do 7-NI. Entretanto, sabe-se que o 7-NI também inibe a enzima MAO-B, ou seja, é possível que o efeito observado tenha sido também em decorrência da inibição da MAO-B. Para examinar essa situação resolveu-se

utilizar a pargilina, um inibidor seletivo da MAO-B. Os resultados comportamentais desse experimento estão representados na Figura 4.

A latência para início do movimento, representada na Figura 4A, foi significativamente maior no grupo MPTP+veículo quando comparado aos grupos controle e MPTP+pargilina 24 h após a cirurgia [$F(5,29)=14,193$; $P<0,0001$]. Não observou-se diferenças significativas entre os grupos para esse parâmetro, em comparação aos grupos controle 7 dias após a cirurgia estereotáxica [$F(5,26)=2,318$; $P<0,072$].

Quanto ao parâmetro frequência de locomoção verificou-se redução significativa desse parâmetro, 24 h após a cirurgia, para o grupo MPTP+veículo em comparação aos grupos controle e MPTP+pargilina [$F(5,32)=7,398$; $P<0,0001$]. Porém, 7 dias após a administração de MPTP não verificou-se nenhuma diferença estatística entre os grupos [$F(5,26)=1,537$; $P<0,213$], como ilustrado na Figura 4B.

Em relação ao parâmetro frequência de levantar (Figura 4C) o grupo tratado com MPTP+veículo apresentou redução significativa em relação ao grupo controle apenas quando avaliado 24 h após a cirurgia [$F(5,29)=4,892$; $P<0,0023$]. Não houve diferenças entre os grupos no tempo de 7 dias após a infusão de MPTP intranigral para esse parâmetro [$F(5,29)=1,525$; $P=0,212$].

De forma semelhante aos demais parâmetros, o tempo de imobilidade, conforme mostrado na Figura 4 D, exibiu aumento significativo no grupo MPTP+veículo em comparação aos grupos controle e MPTP+pargilina, no tempo de 24 h após a cirurgia [$F(5,45)=9,494$; $P<0,0001$]. Por outro lado, também não detectaram-se alterações significativas nesse comportamento 7 dias após a cirurgia [$F(5,25)=2,646$; $P=0,0472$].

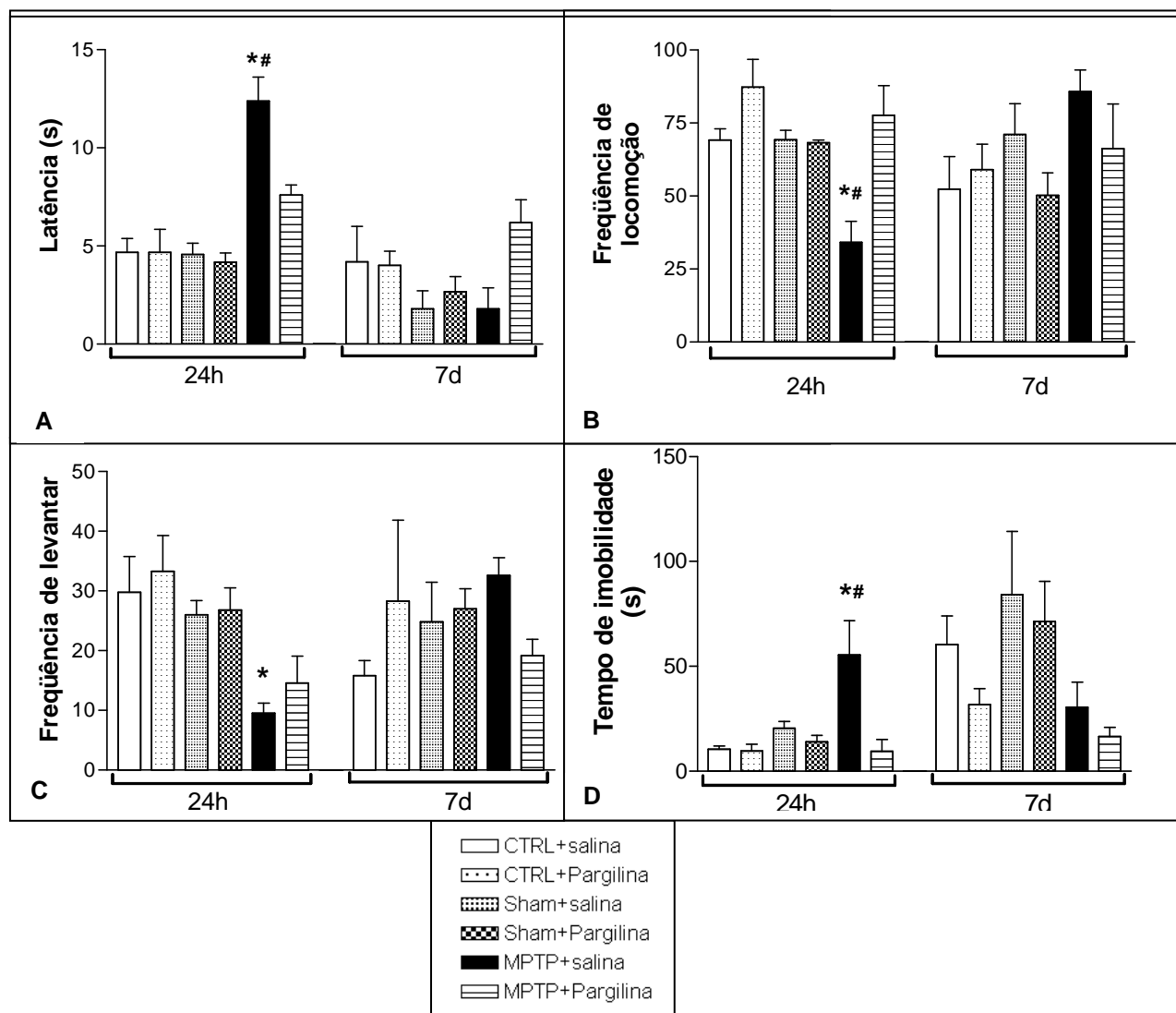


Figura 4. Efeitos da infusão bilateral de MPTP intranigral e de Pargilina (10 mg/kg – i.p, 1h antes da cirurgia estereotáxica) nos parâmetros motores do campo aberto 24 horas e 7 dias após a cirurgia. Em A: Latência para início do movimento, B: Frequência de locomoção, C: Frequência de levantar, D: Tempo de imobilidade. Os valores representam a média \pm S.E.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $P < 0,05$ comparado ao grupo MPTP+Pargilina. ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. (n=10 por grupo).

4.1.2. Efeitos da inibição da NOSn mediada por 7-NI nos parâmetros moleculares de ratos tratados com MPTP

Delineamento experimental

Procurando aprofundar a investigação da possível relação entre a inibição da NOSn com eventos apoptóticos utilizou-se os seguintes grupos: sham+veículo, MPTP+veículo, MPTP+7-NI (n=10). Esses animais passaram pelas mesmas manipulações cirúrgicas referentes àquelas utilizadas para o teste comportamental, entretanto, 24 h após a administração das drogas os animais desses grupos foram perfundidos intracardiacamente para a retirada de seus encéfalos. Esses tecidos foram então crio-seccionados e reagidos, através de metodologia de imunofluorescência, com anticorpos específicos para a detecção das proteínas TH, Bcl2 e NOSn. Essa metodologia foi realizada no tempo de 24 h pois foi o período em que se concentraram a maioria das alterações motoras e também pelo alto custo da técnica.

4.1.2.1. Determinação da expressão nigral de moléculas envolvidas com a resposta neuroprotetora induzida pelo 7-NI

As Figuras 5 a 10 mostram os resultados obtidos para as diferentes combinações de duplas marcações utilizadas (TH/Bcl2 e Bcl2/NOSn) bem como as sobreposições das imagens correspondentes, indicando assim possíveis co-localizações. A Figura 11 apresenta os resultados de um método de quantificação das imuno-marcações baseado no princípio da transformação de Fourier.

A Figura 5 mostra uma imunofluorescência com dupla marcação para TH e Bcl2 realizada no grupo sham 24 horas após a cirurgia estereotáxica.

Verificou-se a presença de uma maciça expressão da enzima TH na SNpc, que por sua vez co-localizou com uma pequena expressão basal da proteína anti-apoptótica Bcl2. Por outro lado, a Figura 6 demonstra uma pequena expressão (salvo as limitações de sensibilidade da metodologia) das enzimas Bcl2 e NOSn no mesmo grupo sham.

A lesão neuronal induzida por MPTP acarretou forte redução da expressão da TH, concomitantemente com a quase completa ausência de expressão da proteína Bcl2 na SNpc, 24 horas após a infusão da neurotoxina (Figura 7). Um efeito semelhante também foi observado em relação às proteínas Bcl2 e NOSn (Figura 8). Entretanto, o tratamento farmacológico com 7-NI, no grupo lesado por MPTP, promoveu um forte aumento na expressão das proteínas TH e Bcl2, que por sua vez apresentaram precisa co-localização (Figura 9). O mesmo efeito não foi observado para a imuno-marcação das proteínas Bcl2 e NOSn na SNpc (Figura 10). As quantificações desses efeitos envolvendo a expressão dessas proteínas, bem como as co-localizações delas podem ser visualizadas graficamente na Figura 11.

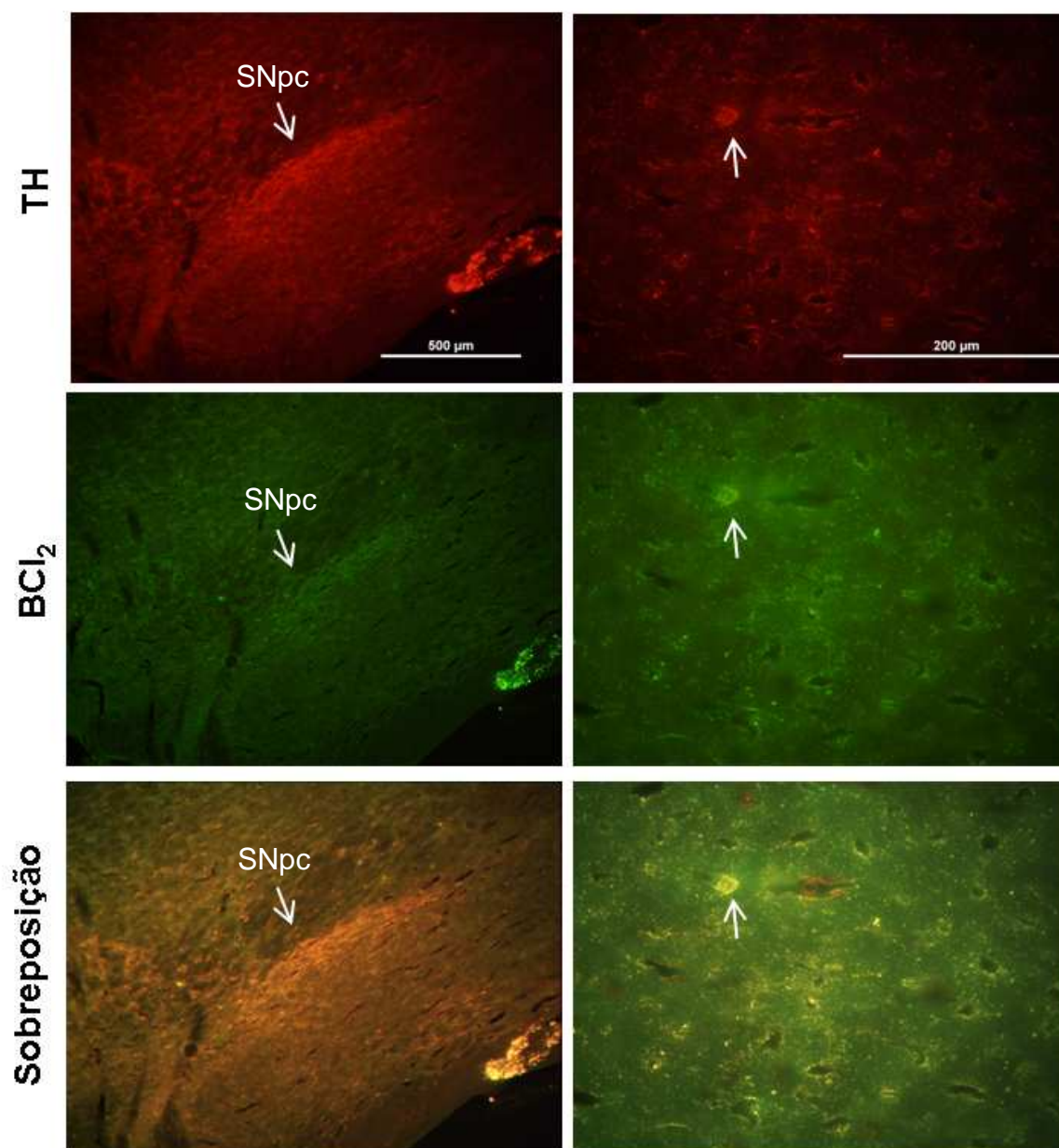


Figura 5. Fotomicrografias representativas de imunofluorescências da SNpc para TH e Bcl2 de animais do grupo sham 24 horas após a cirurgia estereotática. Os dois painéis inferiores correspondem às sobreposições das imagens correspondentes. As setas indicam processos imunopositivos. Legenda: SNpc, substância negra pars compacta. Barras de escala: 500µm (objetiva de 10x), 200µm (objetiva de 40x).

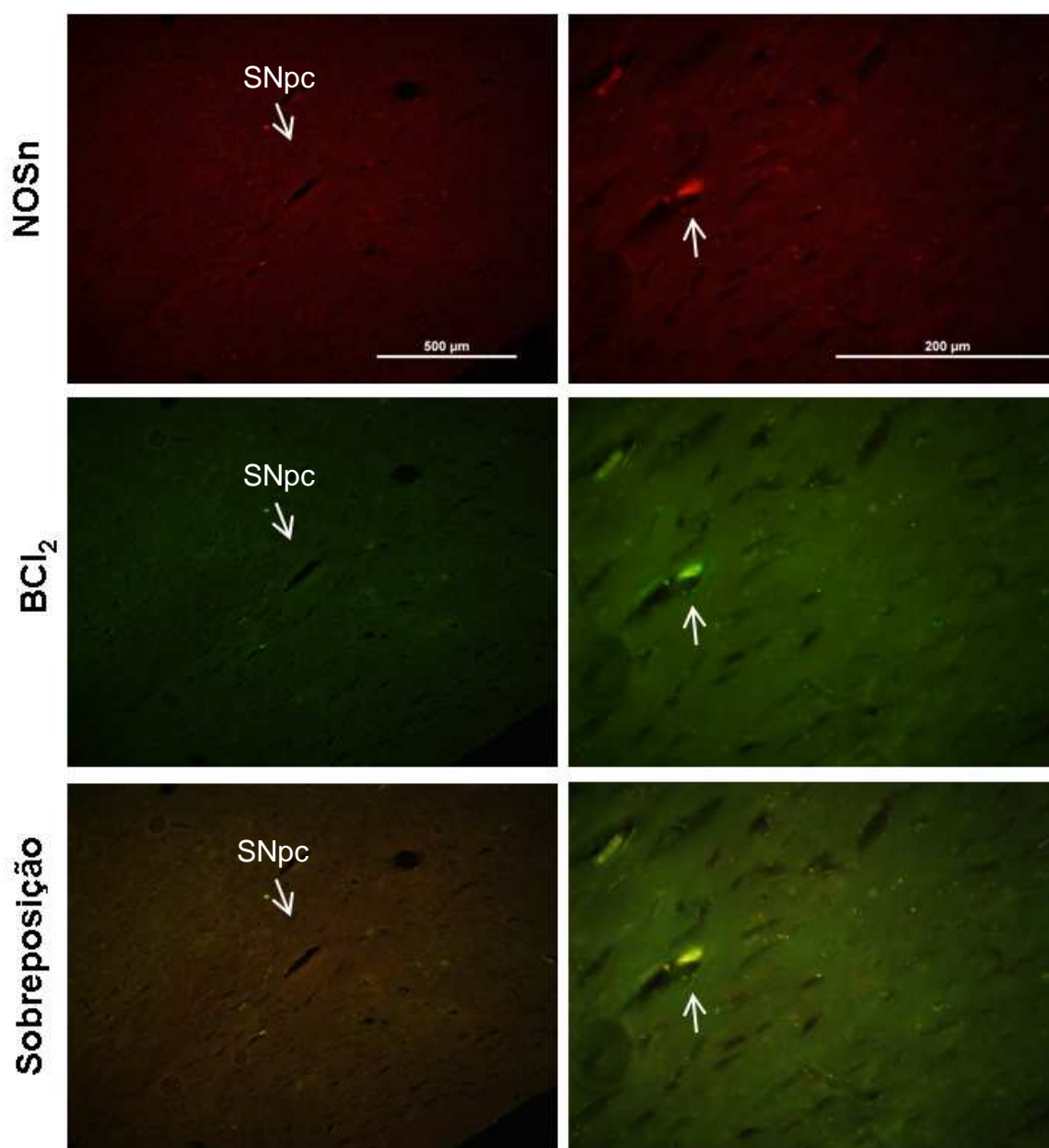


Figura 6. Fotomicrografias representativas de imunofluorescências da SNpc para NOSn e Bcl2 de animais do grupo sham 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Os dois painéis inferiores correspondem às sobreposições das imagens correspondentes. As setas indicam processos imunopositivos. Legenda: SNpc, substância negra pars compacta. Barras de escala: 500µm (objetiva de 10x), 200µm (objetiva de 40x).

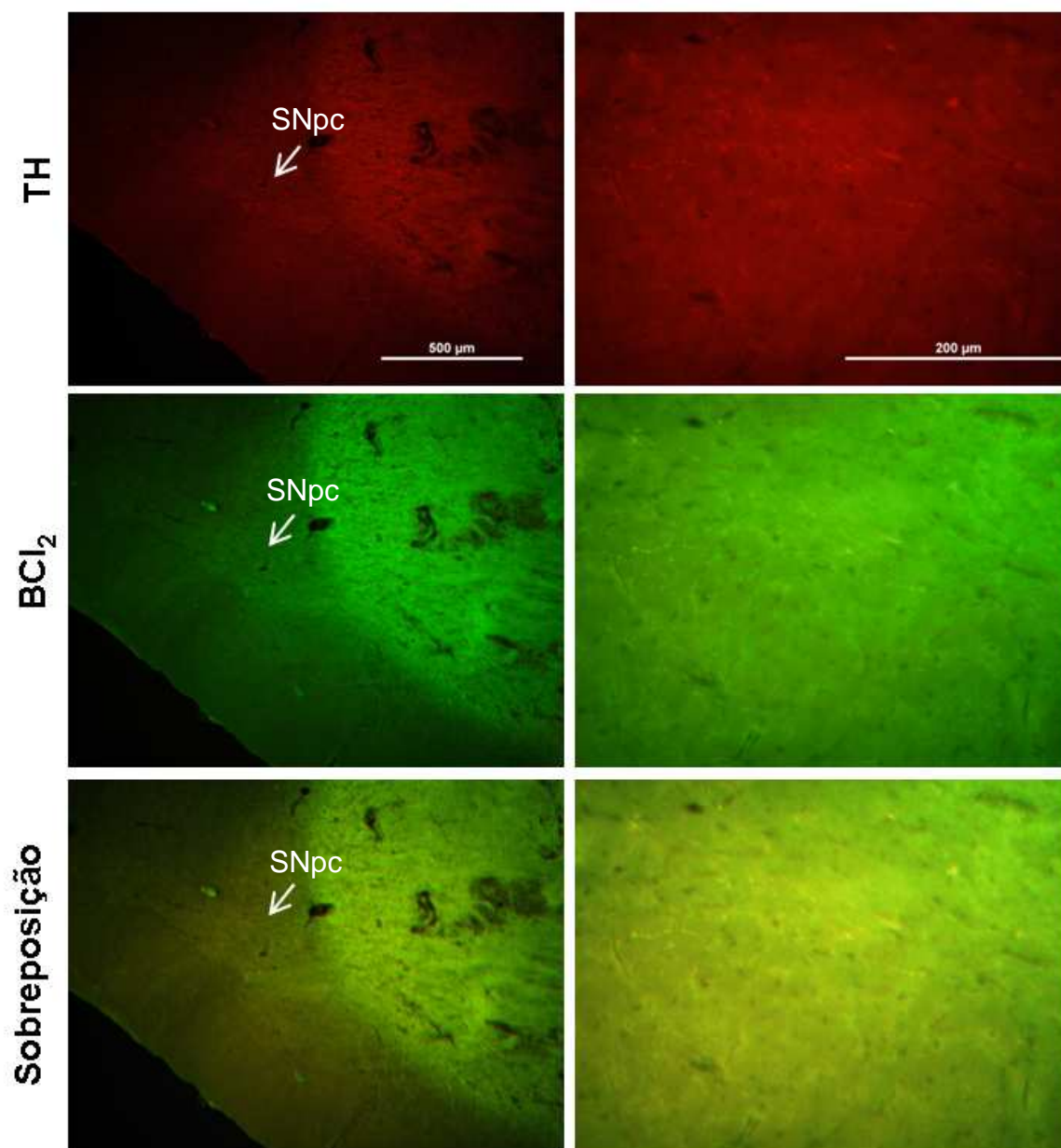


Figura 7. Fotomicrografias representativas de imunofluorescências da SNpc para TH e Bcl2 de animais do grupo MPTP+veículo, 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Os dois painéis inferiores correspondem às sobreposições das imagens correspondentes. Legenda: SNpc, substância negra pars compacta. Barras de escala: 500µm (objetiva de 10x), 200µm (objetiva de 40x).

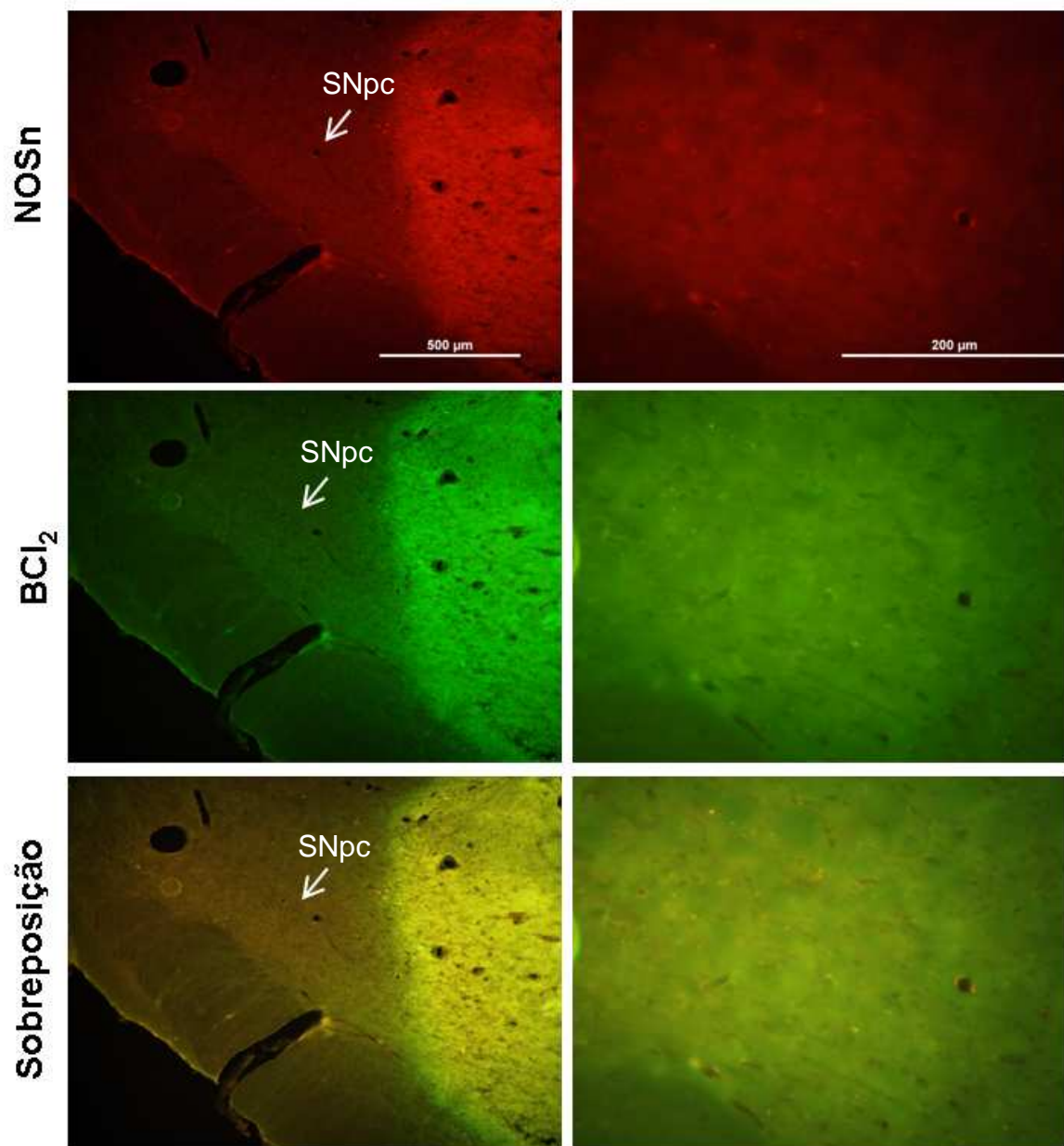


Figura 8. Fotomicrografias representativas de imunofluorescências da SNpc para NOSn e Bcl2 de animais do grupo MPTP+veículo, 24 horas após a cirurgia estereotática. Os dois painéis inferiores correspondem às sobreposições das imagens correspondentes. Legenda: SNpc, substância negra pars compacta. Barras de escala: 500μm (objetiva de 10x), 200μm (objetiva de 40x).

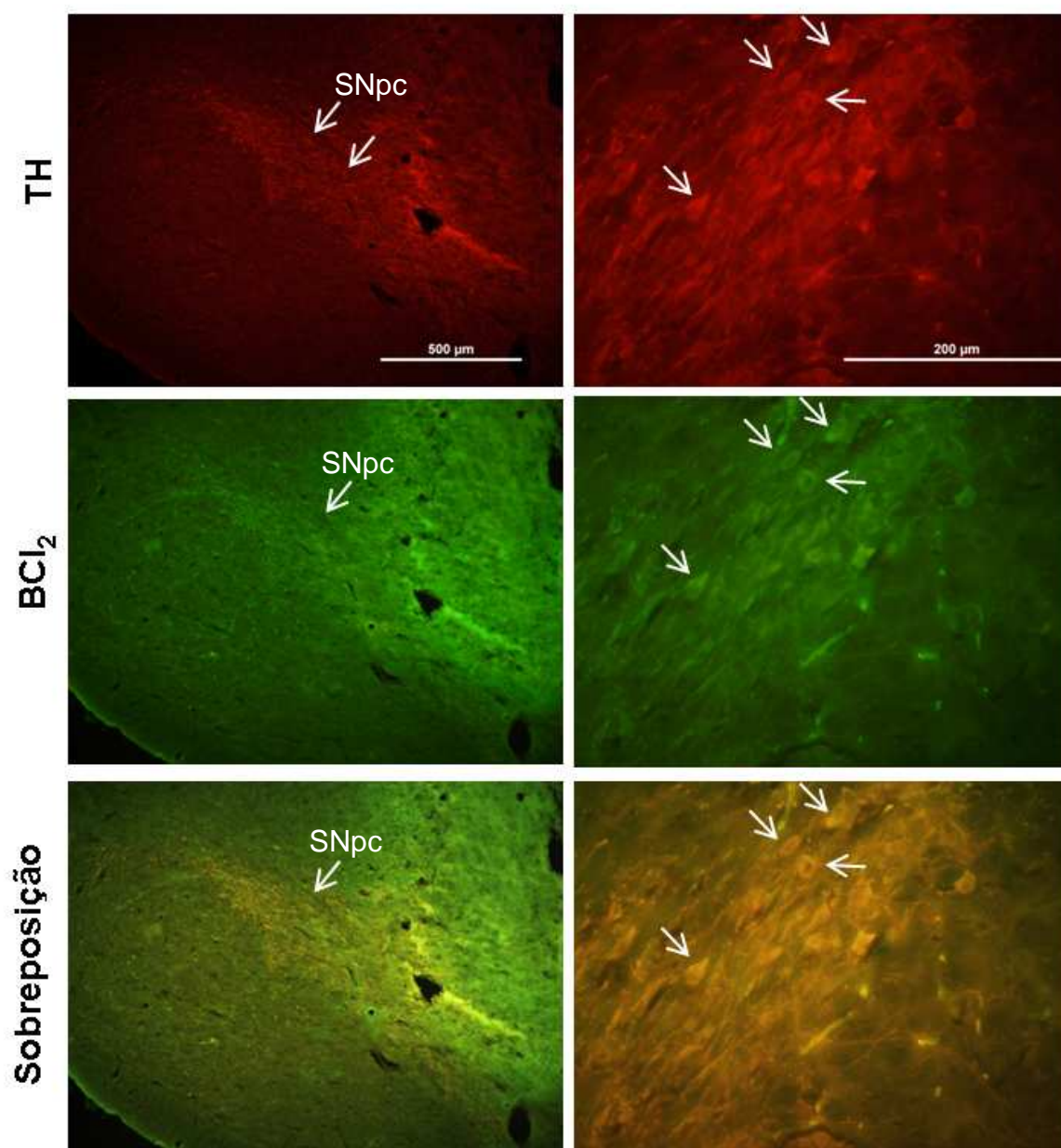


Figura 9. Fotomicrografias representativas de imunofluorescências da SNpc para TH e Bcl2 de animais do grupo MPTP+7-NI, 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Os dois painéis inferiores correspondem às sobreposições das imagens correspondentes. As setas indicam processos imunopositivos. Legenda: SNpc, substância negra pars compacta. Barras de escala: 500μm (objetiva de 10x), 200μm (objetiva de 40x).

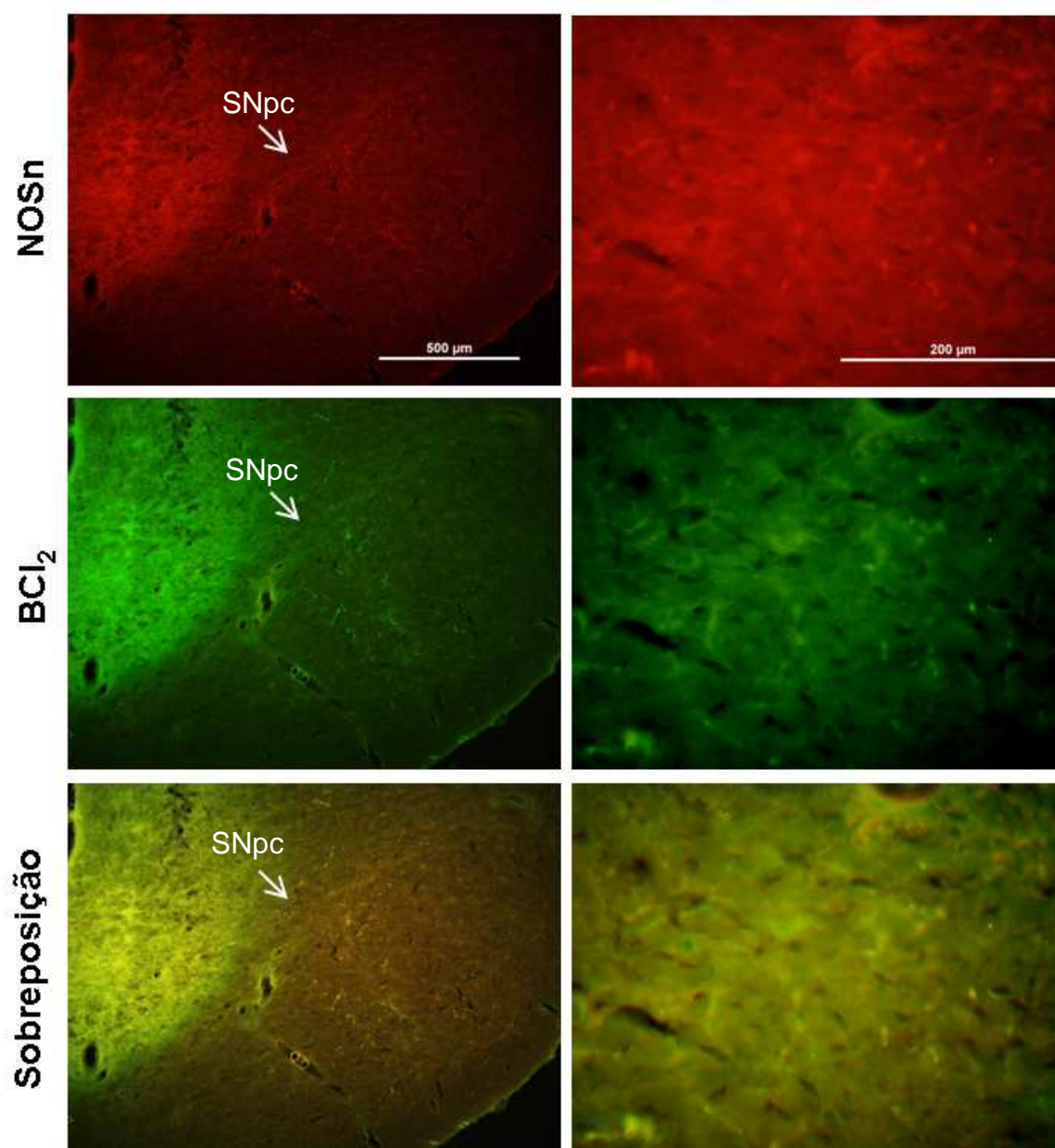


Figura 10. Fotomicrografias representativas de imunofluorescências da SNpc para NOSn e Bcl2 de animais do grupo MPTP+7-NI, 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Os dois painéis inferiores correspondem às sobreposições das imagens correspondentes. Legenda: SNpc, substância negra pars compacta. Barras de escala: 500µm (objetiva de 10x), 200µm (objetiva de 40x).

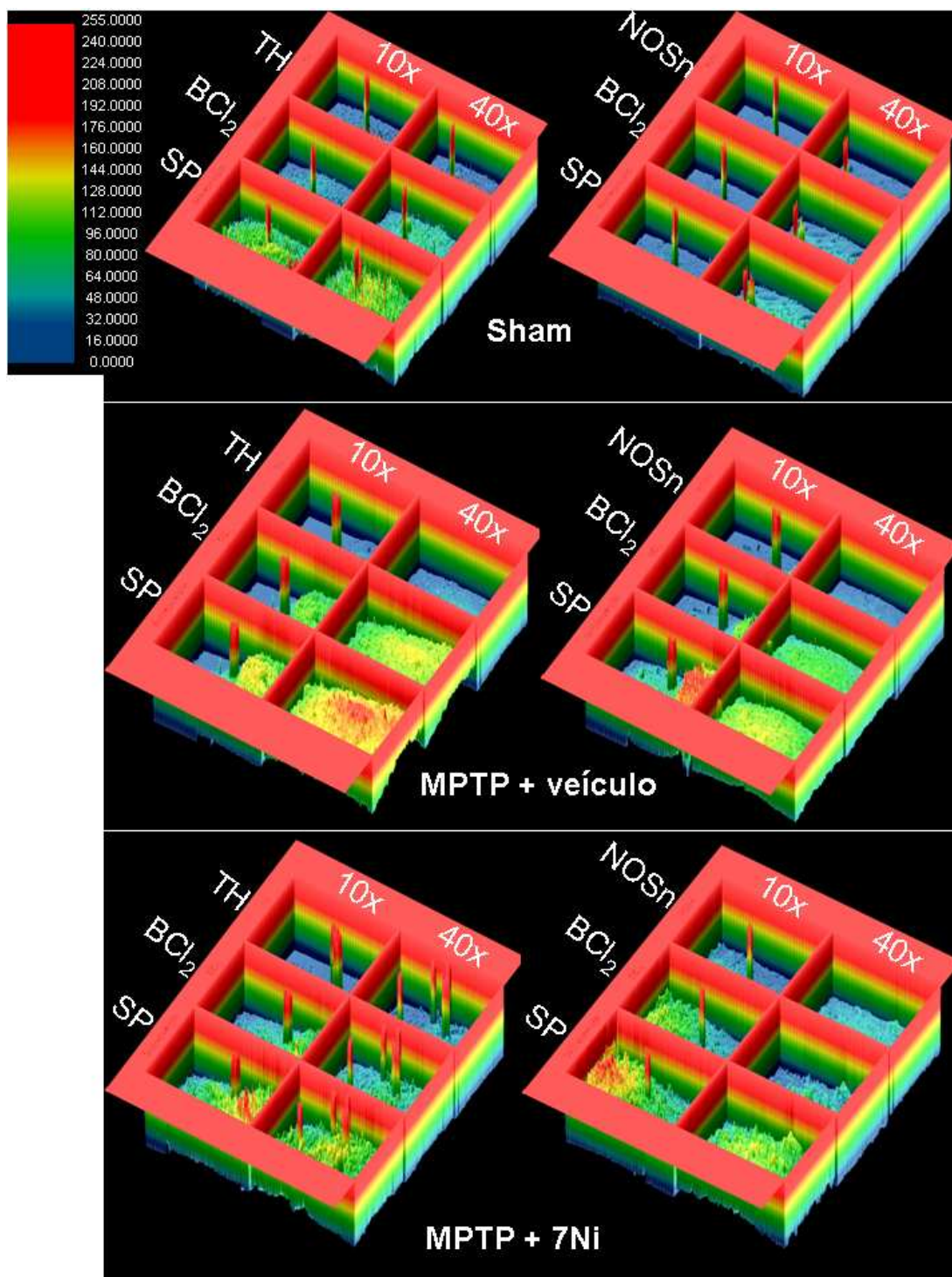


Figura 11. Análise densitométrica através do método de Fourier das diferentes imuno-marcações obtidas através do modelo animal do MPTP e do tratamento farmacológico com 7-Ni. Os três painéis mostrados (sham, MPTP+veículo e MPTP+7-Ni) indicam os diferentes grupos juntamente com as imuno-marcações. Realizou-se a quantificação em ambos os aumentos observados (10 e 40x) numa tentativa de se aumentar a sensibilidade do método. A escala de cores apresenta valores arbitrários.

4.2. EXPERIMENTO 2 – Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares da infusão intranigral de L-DOPA no modelo da DP induzido por MPTP em ratos

Delineamento experimental

O metabolismo da L-DOPA e da própria DA produz quinonas, semi-quinonas, peróxido de hidrogênio e outros oxi-radicais que podem estar envolvidos na toxicidade aos neurônios dopaminérgicos. Nesta etapa, foi estudado o envolvimento da infusão intranigral de L-DOPA e eventos indicativos de neurotoxicidade e/ou morte neuronal.

Para isso, foram analisados os efeitos da administração intranigral de MPTP, L-DOPA bem como da combinação dessas drogas através da realização do teste do campo aberto, da avaliação de neurônios TH imunorreativos (TH-ir) por imuno-histoquímica, da verificação da expressão da proteína TH por *western blotting* e da determinação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA por HPLC.

Cento e cinquenta ratos foram utilizados para o teste comportamental do campo aberto, e esses mesmos animais foram usados para a análise da imuno-histoquímica. Os ratos foram distribuídos em cinco grupos: não-operado (n=30), sham (n=30), MPTP (n=30), L-DOPA (n=30) e MPTP+L-DOPA (n=30).

Para verificar o perfil de expressão da enzima TH ao longo da via nigroestriatal após a administração intranigral das drogas foram utilizados 15 ratos distribuídos nos mesmos grupos descritos previamente, cada grupo com n=3.

Para avaliação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA, amostras de estriados de 6 a 8 animais por grupo foram analisados por HPLC.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica, aos quais foram implantadas cânulas bilateralmente na SNpc de todos os grupos experimentais conforme descrito no item 3.3. Após cinco dias em recuperação do processo cirúrgico e os animais receberam infusão de MPTP (100 µg), L-DOPA (10 µM), salina ou L-DOPA (10 µM) seguido de MPTP (100 µg), diretamente na SN através das cânulas.

4.2.1. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA nos parâmetros motores de ratos tratados com MPTP

Os dados obtidos pelo teste do campo aberto, 24 h após as infusões das drogas, estão representados na Figura 12. A latência para o início do movimento (Figura 12 A) mostrou um aumento significativo desse parâmetro nos grupos que foram administrados com L-DOPA, MPTP e MPTP+L-DOPA em comparação ao grupo controle após a infusão. Os ratos dos grupos L-DOPA e MPTP+L-DOPA apresentaram redução do tempo de latência para início do movimento em comparação ao grupo MPTP [$F(4,32) = 14,57$; $P < 0,05$].

A administração de L-DOPA, MPTP e MPTP+L-DOPA reduziu a frequência de locomoção em comparação ao grupo controle (Figura 12B). Da mesma maneira, o grupo MPTP também apresentou uma redução significativa na frequência de locomoção em comparação aos grupos L-DOPA e MPTP+L-DOPA após a infusão das drogas [$F(4,32)=14,19$; $P < 0,05$]. O grupo L-DOPA não mostrou diferença significativa para o parâmetro de frequência de locomoção em comparação ao grupo MPTP+L-DOPA.

A frequência de levantar (Figura 12C) mostrou que os grupos L-DOPA, MPTP e MPTP+L-DOPA apresentaram redução significativa nesse parâmetro em comparação ao grupo controle após a administração intranigral das drogas [F(4,32)=11,64; $P<0,05$]. Quanto ao tempo de imobilidade (Figura 12D), identificou-se um aumento significativo nos ratos dos grupos L-DOPA, MPTP e MPTP+L-DOPA em comparação ao grupo controle. Além disso, o grupo L-DOPA apresentou um aumento significativo nesse parâmetro em comparação ao grupo MPTP [F(4,32)=31,79; $P<0,05$].

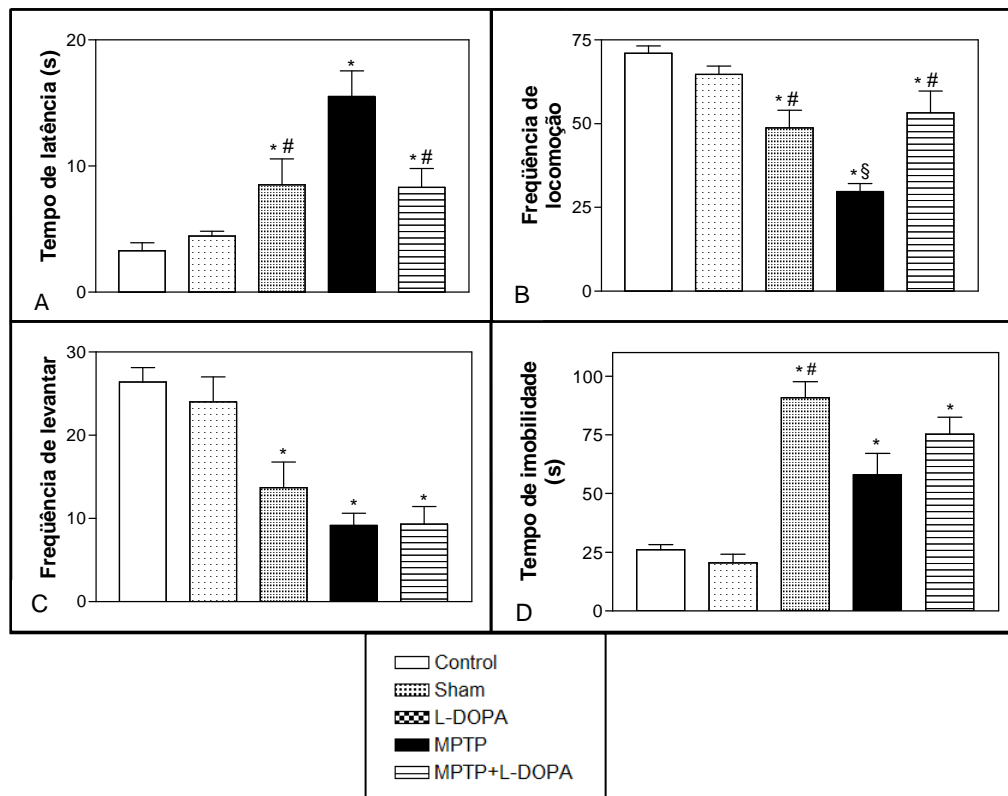


Figura 12. Efeitos da administração de L-DOPA, MPTP, MPTP+L-DOPA intranigral nos parâmetros motores do campo aberto no tempo de 24 h. Em A: Latência para início do movimento, B: Frequência de locomoção, C: Frequência de levantar, D: Tempo de imobilidade. Os valores representam a média \pm S.E.M. * $P<0,05$ comparado ao grupo controle; # $P<0,05$ comparado ao grupo MPTP, § $P<0,05$ comparado ao grupo L-DOPA. ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de Tukey. (n=30 por grupo).

4.2.2. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA na avaliação por imuno-histoquímica para TH em ratos tratados com MPTP

Os efeitos das infusões intranigrais das drogas L-DOPA, MPTP e MPTP+L-DOPA sobre o número de neurônios TH-ir foram examinados por imuno-histoquímica 1 dia após suas administrações para verificar o efeito agudo dessa manipulação farmacológica sobre o sistema dopaminérgico.

Como mostrado nas Figuras 13 e 14 a administração intranigral de MPTP, L-DOPA e MPTP+L-DOPA provocou perda significativa de neurônios TH-ir residentes na SNpc em comparação aos grupos controle e sham [$F(3,30)=55,93$; $P<0,05$]. A administração de MPTP acarretou numa perda mais pronunciada (53,6%) de neurônios TH-ir da SNpc em comparação ao grupo controle ($P<0,001$). Por outro lado, o grupo administrado com L-DOPA apresentou 30,5% de redução do número de neurônios TH-ir da SNpc em comparação ao grupo controle ($P<0,001$). Apesar dessa redução significativa provocada pela L-DOPA, o número de neurônios TH-ir presentes nesse grupo foi significativamente maior quando comparado ao grupo lesado por MPTP (Figura 14).

A administração da combinação MPTP + L-DOPA também resultou em uma significativa perda de 42% de neurônios TH-ir da SNpc em comparação ao grupo controle ($P<0,001$).

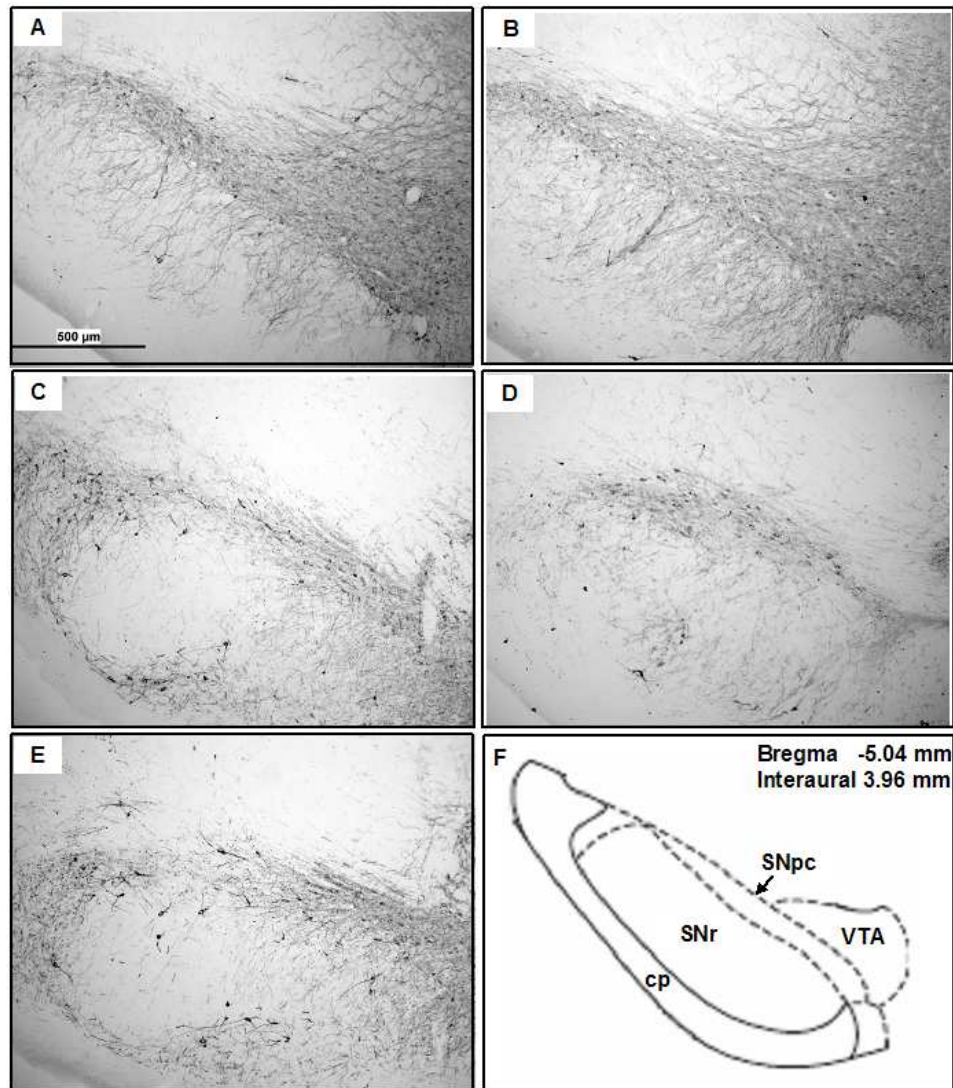


Figura 13. Fotomicrografias representativas de neurônios TH-ir da SN dos seguintes grupos: A: Controle B: sham, C: MPTP, D: L-DOPA, E: MPTP+L-DOPA no tempo de 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Em F está uma representação esquemática da area infundida (Paxinos e Watson, 2005). Legenda: cp, pedúnculo cerebral; SNpc, substância negra pars compacta; SNr, substância negra reticulata; VTA, área tegmental ventral; barra de escala, 500μm.

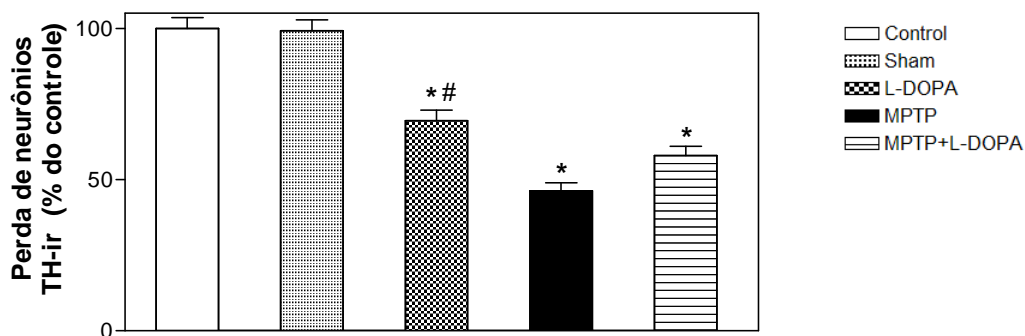


Figura 14. Efeitos da infusão intranigral do L-DOPA, MPTP ou MPTP+L-DOPA na porcentagem de perda de neurônios TH-ir da SNpc de ratos, no tempo de 24 horas após a cirurgia estereotáxica. Resultados expressos como média \pm S.E.M. comparado ao grupo controle ($n=10$). * $P<0,05$ comparado ao grupo controle; # $P<0,05$ comparado ao grupo MPTP; ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls.

4.2.3. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA na expressão da proteína TH em ratos tratados com MPTP

A análise por *Western blotting* revelou que a administração intranigral de MPTP e L-DOPA produziram, em seus respectivos grupos, a redução significativa da expressão da enzima TH na SN em comparação ao grupo controle [$F(4,45)=4,05$; $P<0,05$] (Figura 15).

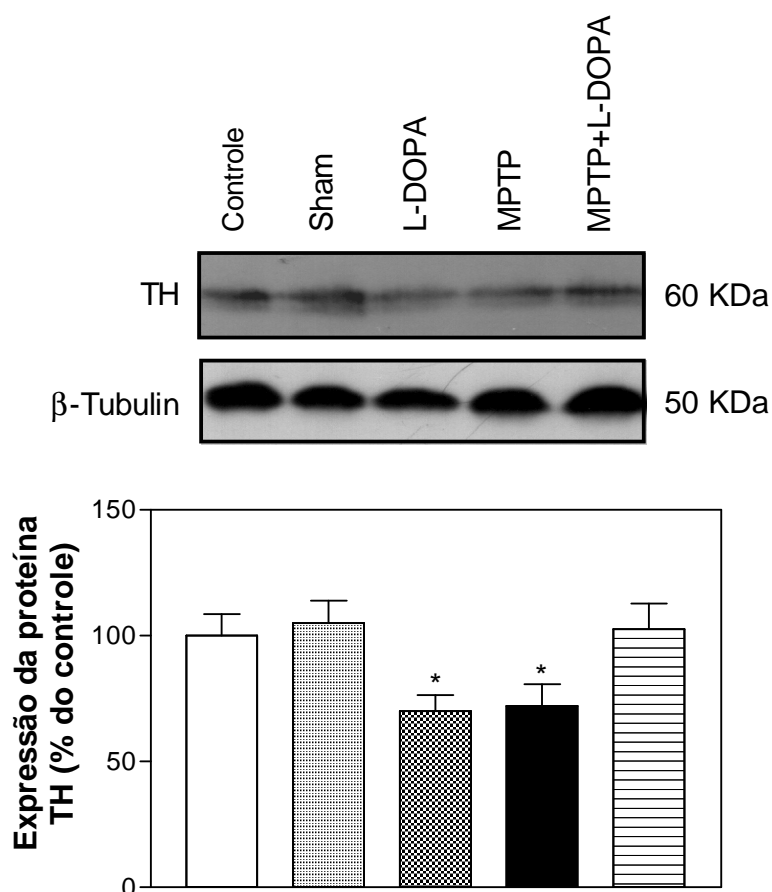


Figura 15. Análise por *Western blotting* da expressão da TH na SN de ratos tratados intranigralmente por MPTP, L-DOPA ou MPTP+L-DOPA no tempo de 24 h após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média \pm S.E.M. * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls.

Entretanto, a mesma análise realizada no estriado, não revelou variações estatisticamente significativas na expressão da proteína TH nos grupos incluídos neste estudo (Figura 16).

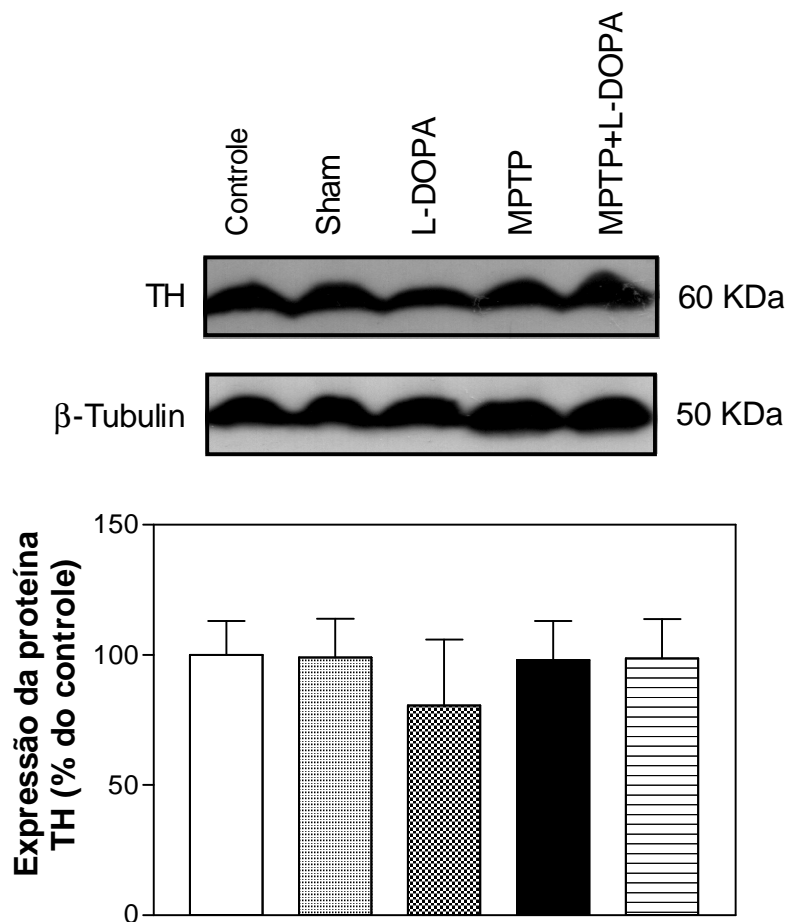


Figura 16. Análise por *Western blotting* da expressão da TH no estriado de ratos tratados intranigralmente por MPTP, L-DOPA ou MPTP+L-DOPA 24 h após a cirurgia estereotáxica. Os valores representam a média \pm S.E.M. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

4.2.4. Efeitos da infusão intranigral de L-DOPA na determinação dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA em ratos tratados com MPTP

Os níveis de DA, DOPAC e HVA foram analisados nas amostras de estriado dos 5 grupos e o resultado da análise está representado na Figura 17.

Os níveis de DA foram significativamente reduzidos no estriado dos grupos L-DOPA ($P < 0,001$), MPTP ($P < 0,001$) e L-DOPA+MPTP ($P < 0,001$) em comparação aos grupos sham e controle [$F(4,24)=5,45$; $P < 0,001$] (Figura 17 A).

A Figura 17 B demonstra que os níveis de DOPAC não foram alterados nos grupos tratados com L-DOPA quando comparados aos grupos controle e

sham. Entretanto, o grupo MPTP mostrou um aumento significativo nos níveis de DOPAC em comparação ao grupo controle ($P<0,05$), sham ($P<0,05$) e L-DOPA ($P<0,05$) [$F(4,28)=3,91$; $P<0,01$]. De forma similar, os níveis de HVA mostraram-se aumentados no grupo MPTP quando comparados aos grupos controle ($P<0,05$), sham ($P<0,01$), L-DOPA ($P<0,01$) e MPTP+L-DOPA ($P<0,01$) [$F(4,32)=5,47$; $P<0,002$] (Figura 17 B).

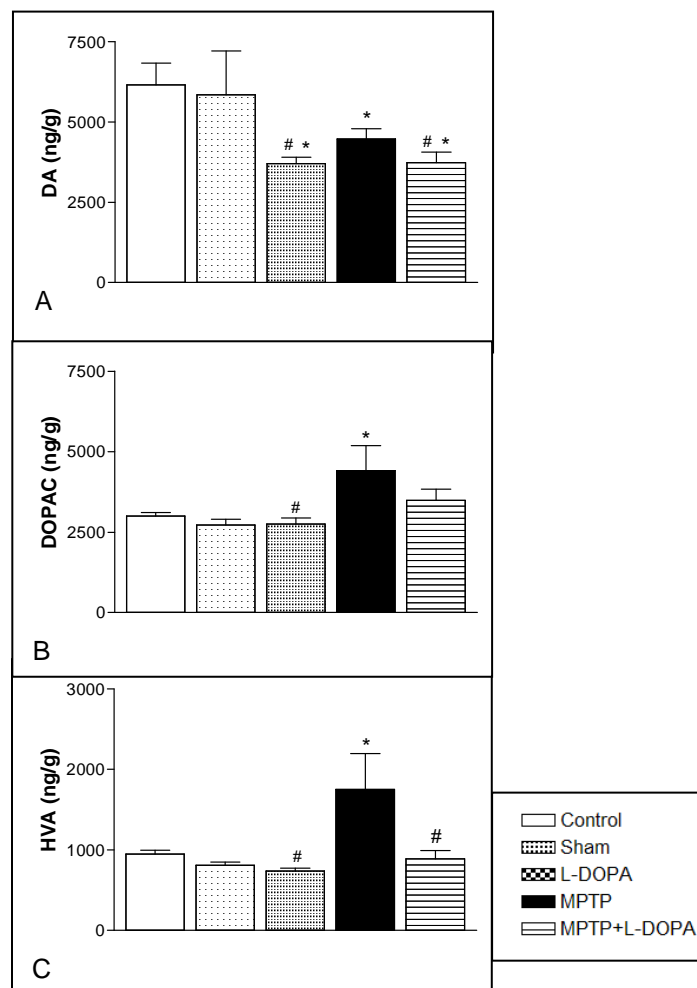


Figura 17. Análise por HPLC dos níveis estriatais de DA, DOPAC e HVA de ratos tratados intranigralmente por MPTP, L-DOPA ou MPTP+L-DOPA no tempo de 24 h após a cirurgia estereotáxica. Em A: Concentração estriatal de DA, B: Concentração estriatal de DOPAC, C: Concentração estriatal de HVA. Os valores representam à média \pm S.E.M. * $P<0,05$ comparado ao grupo controle; # $P<0,05$ comparado ao grupo MPTP. ANOVA para medidas e repetidas seguida pelo teste de Tukey. Os valores representam à média \pm S.E.M.

Delineamento experimental

Na tentativa de reproduzir um modelo animal capaz de gerar uma neurodegeneração progressiva do sistema dopaminérgico nigroestriatal, dessa forma recapitulando os mecanismos comportamentais e moleculares observados na DP, elaborou-se um protocolo de administrações intranigrais repetidas de MPTP. Para isso, foi adotado um esquema de três dias de intervalo entre as infusões de MPTP totalizando três infusões em nove dias, devido a existência de um efeito motor compensatório observado três dias após uma única infusão dessa neurotoxina (Lima *et al.*, 2006).

Cento e oitenta animais pesando entre 280-320 g foram distribuídos nos seguintes grupos: Controle, sham e MPTP. Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica, em que foram implantadas cânulas bilateralmente na SNpc de todos os grupos experimentais. As infusões foram feitas a partir de cânulas implantadas conforme descrito no item 3.3.

Então os animais foram observados no campo aberto nos tempos: 1 dia após 1ª infusão, 3 dias após 1ª infusão, 1 dia após 2ª infusão, 3 dias após 2ª infusão, 1 dia após 3ª infusão e 3 dias após 3ª infusão, totalizando 9 dias. Para avaliar os prejuízos locomotores examinaram-se os parâmetros de distância percorrida e velocidade média no teste do campo aberto. Em seguida, os mesmos animais foram então perfundidos para a fixação dos encéfalos para posterior realização dos ensaios de imuno-histoquímica. Posteriormente realizou-se mesmo protocolo experimental, que utilizou um número adicional de 54 ratos, porém esses animais foram sacrificados para a extração da SN e subsequente análise da expressão da proteína TH por *western blotting*.

4.3.1. Efeitos das administrações repetidas de MPTP intranigral em ratos nos parâmetros motores

Os parâmetros motores avaliados no teste do campo aberto demonstraram que o protocolo que adotou infusões repetidas de MPTP produziu prejuízo significativo e prolongado nas distâncias percorridas pelos animais que foram lesados pela neurotoxina. O primeiro tempo analisado (1 dia após 1ª infusão) revelou uma redução significativa ($P < 0,05$) na distância percorrida pelos ratos do grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham [$F(2,25)=13,44$; $P < 0,05$] (Figura 18A).

Entretanto, 3 dias após a 1ª Infusão não observou-se diferença significativa entre os grupos observados indicando uma recuperação da locomoção no grupo MPTP [$F(2,21)=16,06$; $P < 0,05$] (Figura 18B). Porém, quando se analisou os outros tempos de observação (1 dia após a 2ª infusão, 3 dias após a 2ª infusão, 1 dia após a 3ª infusão e 3 dias após a 3ª infusão) detectou-se um persistente prejuízo motor por parte do grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham (Figuras 18C-F). A Figura 19 detalha mais especificamente o efeito temporal da administração intranigral de MPTP sobre a distância percorrida. Após a 2ª infusão o prejuízo motor tornou-se praticamente constante, prolongando-se até o final da observação comportamental (Figura 19).

No terceiro tempo de observação (1 dia após 2ª infusão) a distância percorrida apresentou-se reduzida para o grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham [$F(2,17)=3,97$; $P < 0,05$] (Figuras 18B e 19). Três dias após a 2ª infusão de MPTP (quarto tempo de observação), o mesmo grau de

alteração motora foi observado nos grupos testados, ou seja, a distância percorrida foi reduzida nos ratos do grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham [$F(2,20)=3,04$; $P<0,05$] (Figuras 18 D e 19). Seguindo o mesmo padrão de prejuízo motor, um dia após a 3ª infusão de MPTP (quinto tempo de observação) verificou-se redução na distância percorrida [$F(2,18)=4,35$; $P<0,05$] para o grupo lesado, em comparação aos grupos controle e sham, mostrado nas Figuras 18 E e 19. Finalmente, o último tempo de observação (3 dias após a 3ª infusão) exibiu o mesmo padrão motor verificado até então, ou seja, com um prejuízo constante nos animais do grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham [$F(2,20)=4,25$; $P<0,05$] (Figuras 18F e 19).

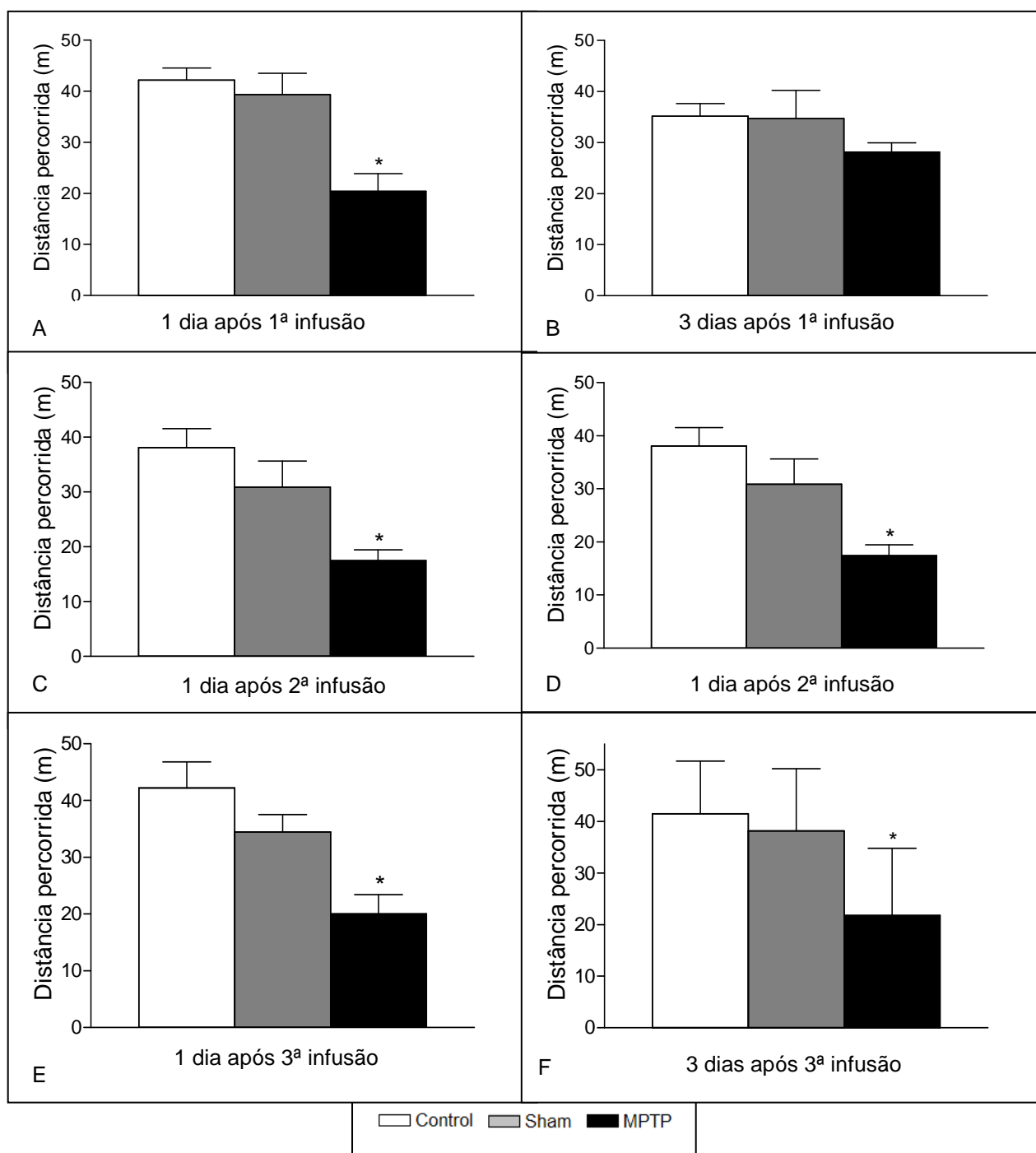


Figura 18. Efeitos das administrações repetidas de MPTP intranigral no parâmetro de distância percorrida durante o teste do campo aberto. **A:** MPTP 1 dia após 1ª infusão, **B:** MPTP 3 dias após 1ª infusão, **C:** MPTP 1 dia após 2ª infusão, **D:** MPTP 3 dias após 2ª infusão, **E:** MPTP 1 dia após 3ª infusão, **F:** MPTP 3 dias após 3ª infusão. Os valores são expressos como média ± S.E.M. (n=10 animais por grupo). *P<0,05 comparado ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

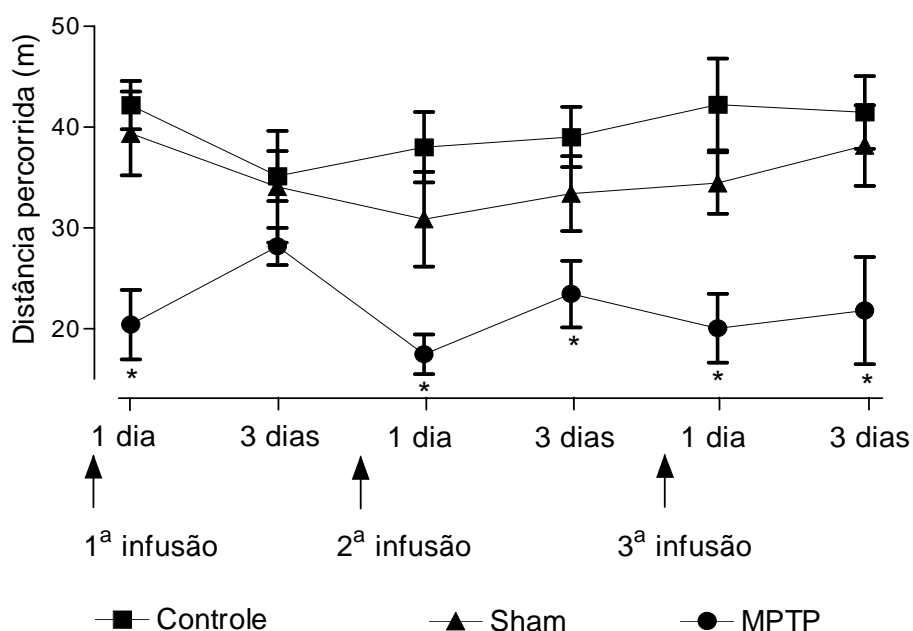


Figura 19. Efeito temporal da administração repetida de MPTP intranigral no parâmetro de distância percorrida durante o teste do campo aberto. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. ($n=10$ animais por grupo). * $P<0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

De maneira análoga à distância percorrida, o parâmetro velocidade média no campo aberto apresentou-se igualmente alterado em todos os tempos de observação. Nesse sentido, 1 dia após a 1ª infusão detectou-se uma redução significativa da velocidade média de ambulação para o grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham [$F(2,24)=17,76$; $P<0,001$] (Figuras 20A e 21). Em oposição a esse efeito de prejuízo motor, 3 dias após a 1ª infusão verificou-se uma recuperação dos valores de velocidade média, para o grupo MPTP, que não diferiram estatisticamente quando comparados aos grupos controle e sham [$F(2,24)=15,56$; $P<0,05$] (Figuras 20B e 21).

Considerando o terceiro tempo de observação (1 dia após 2ª infusão), o parâmetro de velocidade média de locomoção apresentou-se reduzido no grupo MPTP quando comparado aos grupos controle e sham [$F(2,19)=4,63$; $P<0,05$] (Figuras 20C e 21). De maneira similar, três dias após a 2ª infusão de

MPTP (quarto tempo de observação), o mesmo perfil de alterações motoras foi observado nos grupos testados, ou seja, a velocidade de ambulação (Figuras 20D e 21) também foi reduzida [$F(2,21)=3,55$; $P<0,05$] para o grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham. Um dia após a 3ª infusão de MPTP mostrou-se uma redução na velocidade média de ambulação [$F(2,18)=4,36$; $P<0,05$] nos animais do grupo MPTP em comparação aos grupos controle e sham, mostrado nas Figuras 20E e 21. Corroborando os dados de distância percorrida, a velocidade média de locomoção também apresentou-se reduzida no último tempo de observação (3 dias após 3ª infusão de MPTP), indicando um prejuízo motor constante [$F(2,18)=4,62$; $P<0,05$] (Figuras 20F e 21).

A Figura 21 detalha mais especificamente o efeito temporal da administração intranigral de MPTP sobre a velocidade média. Após a 2ª Infusão o prejuízo motor tornou-se praticamente constante, prolongando-se até o final da observação comportamental (Figura 21).

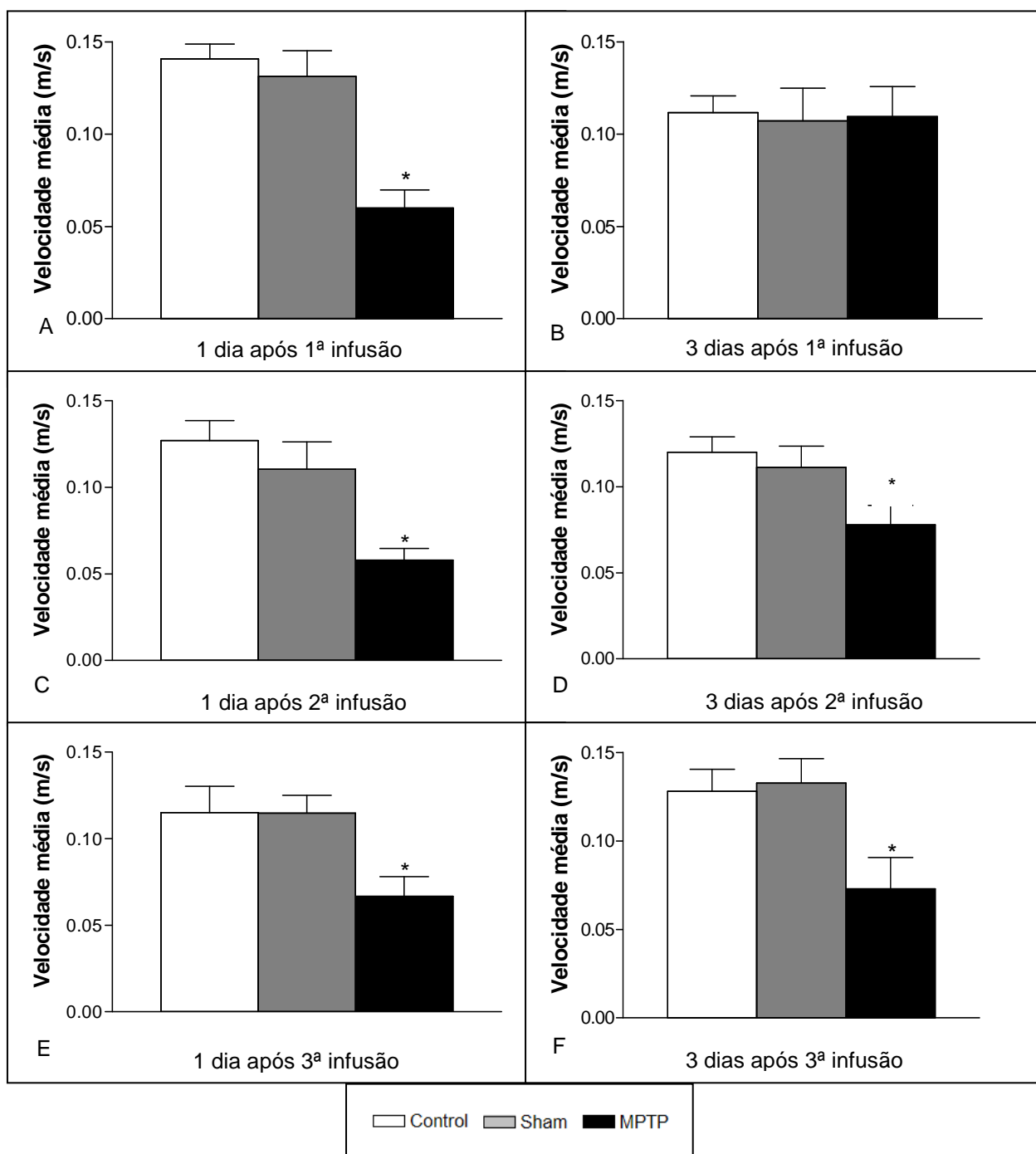


Figura 20. Efeito da administração repetida de MPTP intranigral no parâmetro velocidade média de ambulação durante o teste do campo aberto. **A:** MPTP 1 dia após 1ª infusão, **B:** MPTP 3 dias após 1ª infusão, **C:** MPTP 1 dia após 2ª infusão, **D:** MPTP 3 dias após 2ª infusão, **E:** MPTP 1 dia após 3ª infusão, **F:** MPTP 3 dias após 3ª infusão. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. (n=10 animais por grupo). * $P < 0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

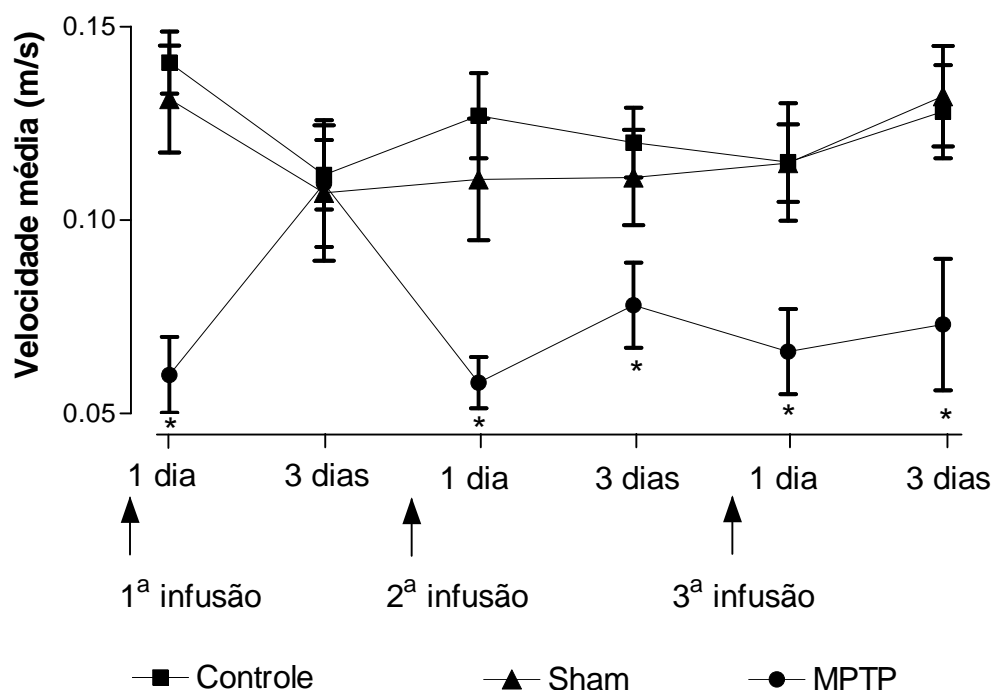


Figura 21. Efeito temporal das administrações repetidas de MPTP intranigral no parâmetro velocidade média de ambulação durante o teste do campo aberto. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. ($n=10$ animais por grupo). * $P<0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

Todas as alterações comportamentais indicadas nas Figuras 18,19, 20 e 21 são ilustradas e corroboradas pelas trajetórias representativas, apresentadas na Figura 22, dos animais dos diferentes grupos (controle, sham e MPTP) durante os diferentes tempos de observação. Essas trajetórias ilustram os prejuízos motores decorrentes das administrações de MPTP.

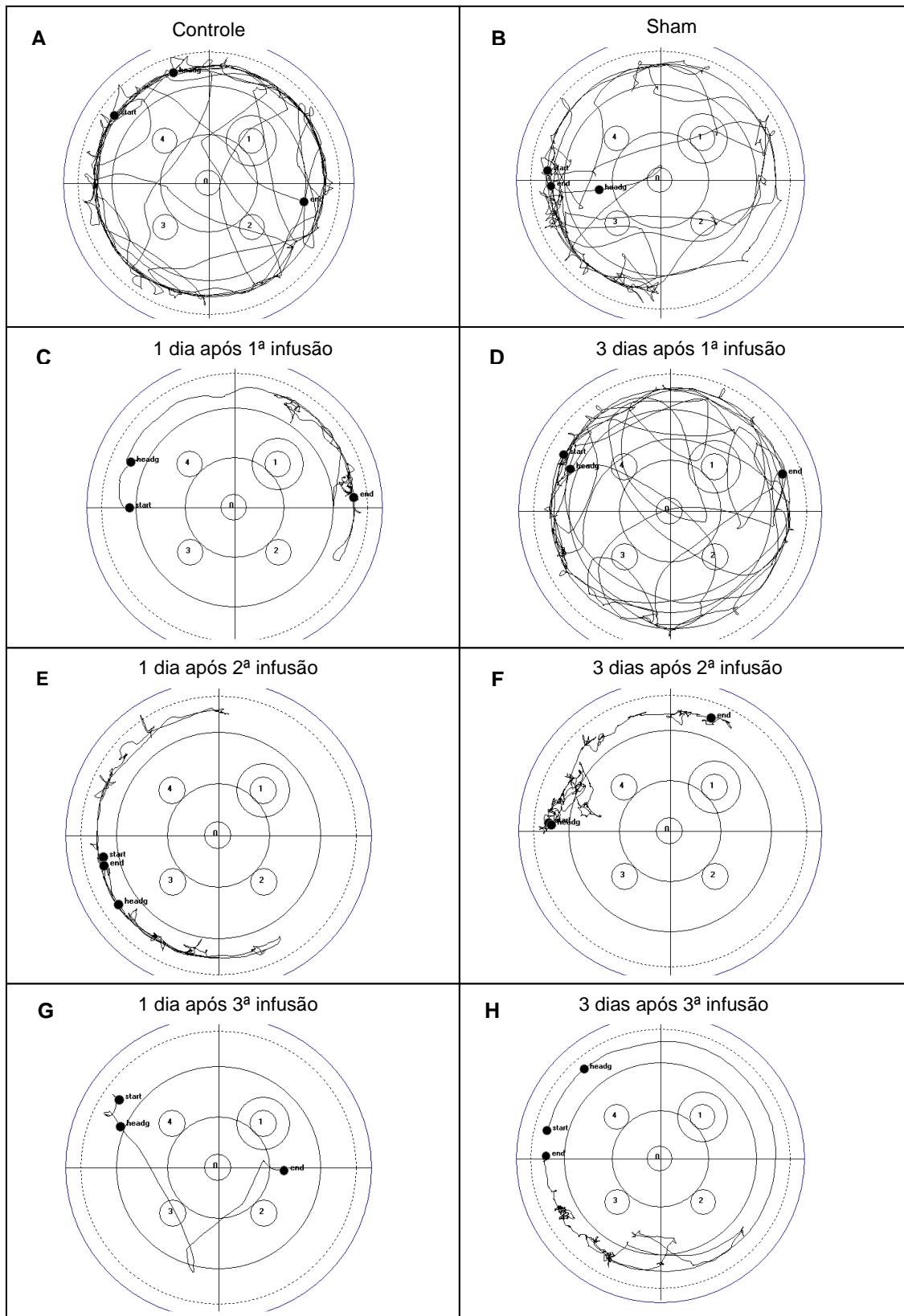


Figura 22. Trajetórias representativas de cada grupo (A: Controle, B: sham, C: MPTP 1 dia após 1ª infusão, D: MPTP 3 dias após 1ª infusão, E: MPTP 1 dia após 2ª infusão, F: MPTP 3 dias após 2ª infusão, G: MPTP 1 dia após 3ª infusão, H: MPTP 3 dias após 3ª infusão) durante o teste do campo aberto.

Como mostrado nas Figuras 23 e 24, a administração única ou repetida de MPTP reduziu de maneira similar a imuno-marcação dos neurônios TH-ir presentes na SNpc em comparação aos grupos controle e sham [$F(10,47)=17,25$; $P<0,05$]. Um dia após 1ª infusão de MPTP detectou-se uma significativa redução de neurônios TH-ir (53,8%) em comparação aos grupos controle e sham.

Da mesma maneira, 3 dias após a 1ª infusão de MPTP foi verificada uma redução similar do número de neurônios TH-ir (55%) em comparação aos grupos controle e sham. A mesma análise foi realizada 1 dia após 2ª infusão de MPTP, e mostrou uma perda neuronal de 52% no grupo lesado em comparação aos grupos controle e sham. Três dias após a 2ª infusão de MPTP revelou-se uma perda neuronal similar (56%) ao que foi observada nos tempos de observação prévios. Os últimos dois tempos de observação indicaram semelhante perda neuronal causada pelo MPTP (54%) 1 dia após 3ª infusão de MPTP e (57%) 3 dias após 2ª infusão de MPTP.

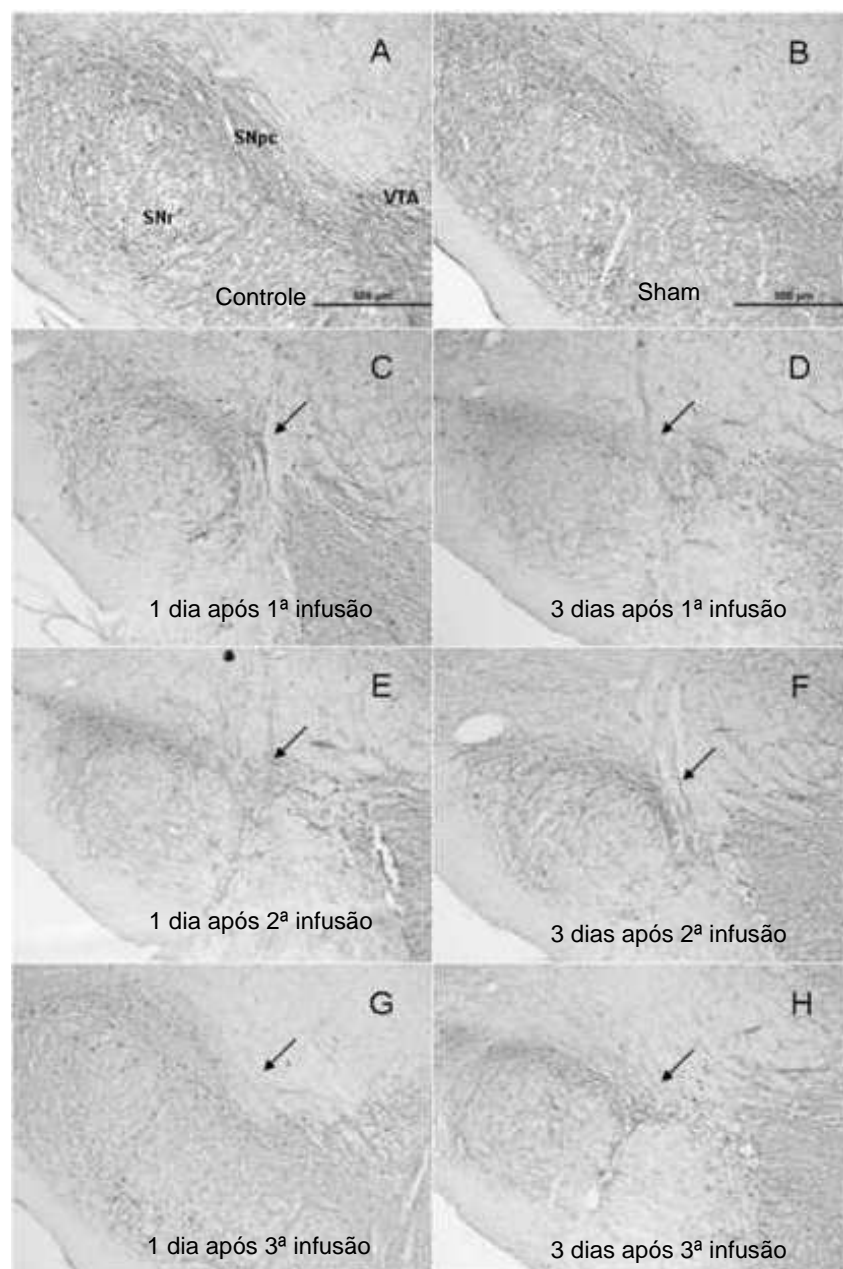


Figura 23. Fotomicrografias representativas de neurônios TH-ir da SN dos seguintes grupos: A: Controle B: sham, C: MPTP 1 dia após 1^a. Infusão, D: MPTP 3 dias após 1^a infusão, E: MPTP 1 dia após 2^a infusão, F: MPTP 3 dias após 2^a infusão, G: MPTP 1 dia após 3^a infusão, H: MPTP 3 dias após 3^a infusão. Legenda: SNpc, substantia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra reticulata; VTA, área tegmental ventral. As setas indicam os sítios das lesões. Barra de escala, 500µm.

Os neurônios TH-ir foram detectados proeminentemente na SNpc dos ratos dos grupos controle e sham (Figura 23A e B).

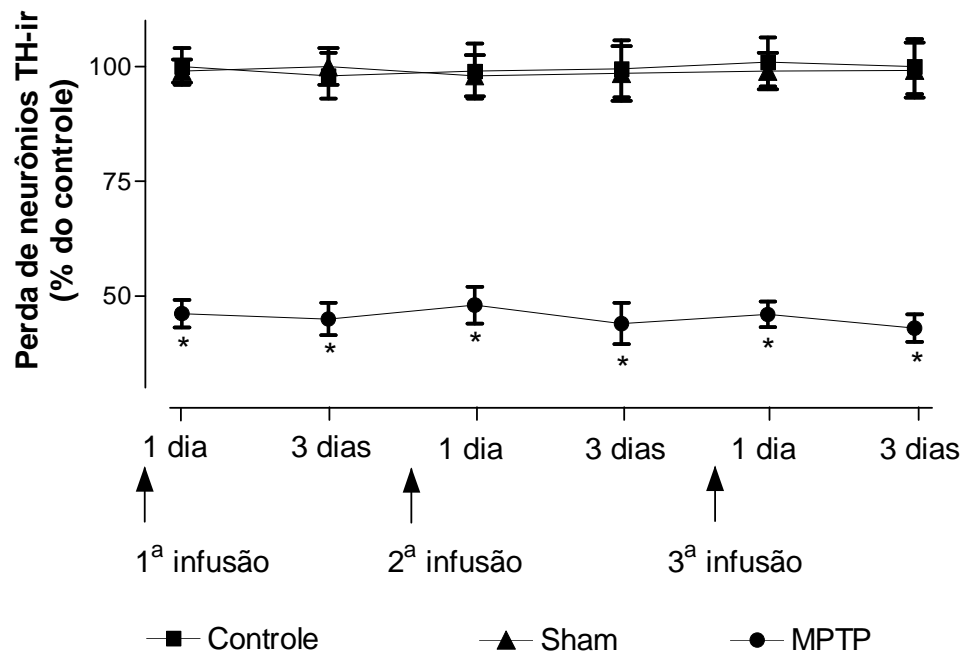


Figura 24. Efeitos da administração de MPTP intranigral na porcentagem de neurônios TH-ir da SNpc de ratos. Os valores representam à média \pm S.E.M. * $P < 0.05$ comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls.

4.3.3. Efeitos das administrações repetidas de MPTP intranigral na expressão da proteína TH em ratos

A análise por *Western blotting* da SN, mostrou uma redução da expressão da proteína TH 1 dia após a 1ª infusão de MPTP em comparação aos grupos controle e sham [$F(9,73)=17,16$; $P<0,05$] (Figura 25A). Três dias após a 1ª infusão, a expressão da proteína TH permaneceu reduzida em 26% em comparação aos grupos controle e sham (Figura 25B). Um dia após a 2ª infusão de MPTP observou-se uma significativa redução de 30% da expressão da TH em comparação aos grupos controle e sham (Figura 25C). Assim como, 3 dias após a 2ª infusão, a expressão da TH permaneceu em níveis similares de redução de expressão (20%) quando comparados aos grupos controle e sham (Figura 25D). Um dia após a 3ª infusão de MPTP detectou-se uma redução de expressão de 21% quando comparados aos grupos controle e sham (Figura 25E). Finalmente, o ultimo tempo de observação analisado (3 dias após 3ª infusão de MPTP), revelou que a expressão da enzima TH permaneceu reduzida em 20% nos ratos deste grupo em comparação aos grupos controle e sham (Figura 25 F).

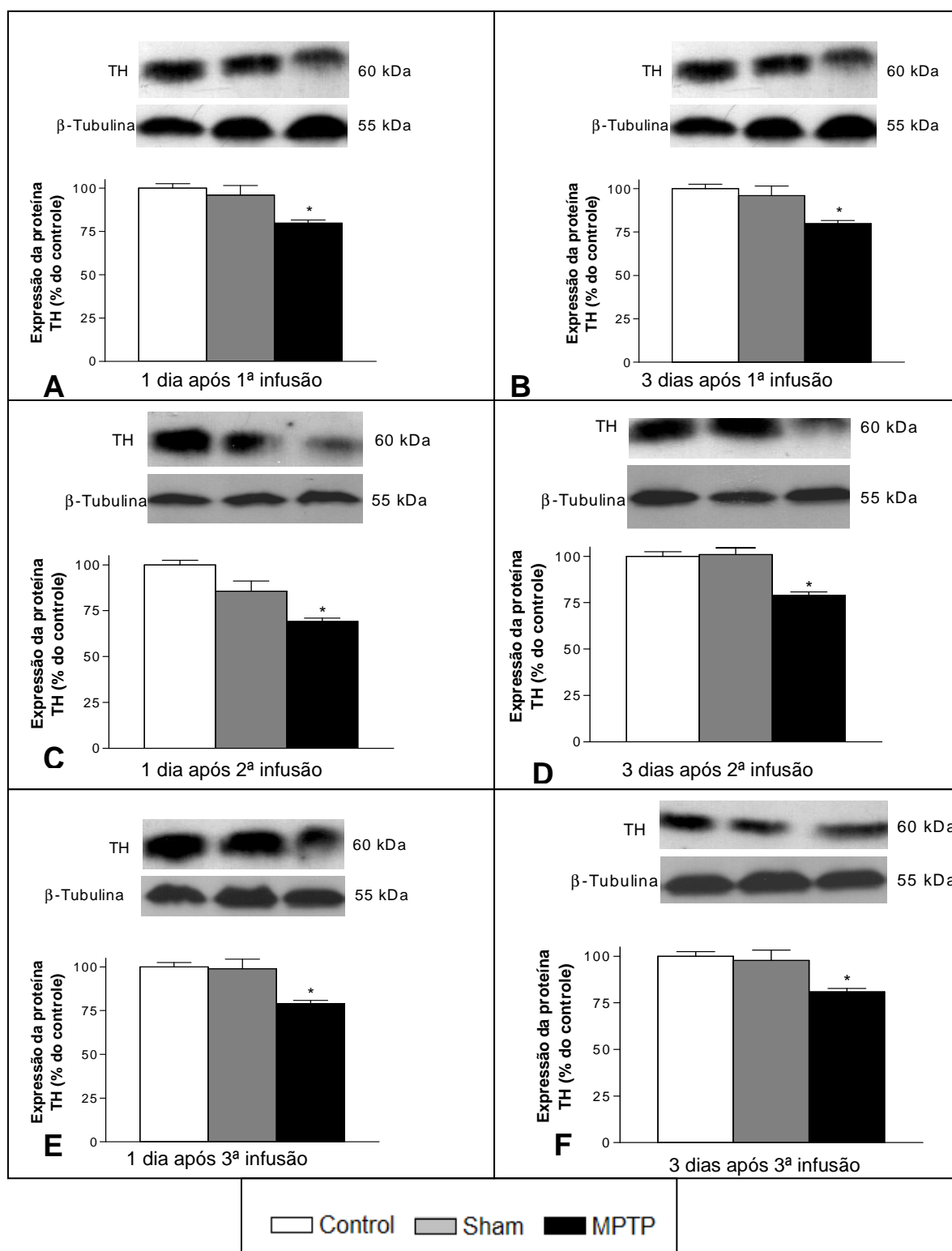


Figura 25. Análise por *wWestern blotting* da expressão da proteína TH na SN dos grupos após a infusão repetida de MPTP intranigral. A: MPTP 1 dia após 1ª infusão, B: MPTP 3 dias após 1ª infusão, C: MPTP 1 dia após 2ª infusão, D: MPTP 3 dias após 2ª infusão, E: MPTP 1 dia após 3ª infusão, F: MPTP 3 dias após 3ª infusão. Os valores são expressos como média \pm S.E.M. ($n=10$ animais por grupo). * $P<0,05$ comparado ao grupo controle. ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls.

5.1. EXPERIMENTO 1 – Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares mediados pelo 7-NI no modelo animal da DP induzido por MPTP em ratos

Os resultados desse experimento mostram que ocorreu um provável efeito neuroprotetor mediado pela inibição da enzima NOSn. Esse efeito pôde ser caracterizado na avaliação comportamental, uma vez que todos os parâmetros analisados apresentaram uma recuperação nos grupos que foram tratados com 7-NI. Além disso, observou-se um impedimento da ocorrência do efeito neurotóxico promovido pelo MPTP, considerando que os neurônios foram menos afetados, ou seja, protegidos da lesão quando ocorreu o tratamento farmacológico com 7-NI. Outra característica molecular interessante, advinda da inibição da NOSn, foi o efeito indutor da expressão da molécula anti-apoptótica Bcl2 nos neurônios dopaminérgicos residentes na SNpc.

De maneira geral, níveis reduzidos de expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl2, Bcl-xl e aumento de expressão da proteína pró-apoptótica Bax e da ativação das caspases 1 e 3 têm sido reportados em pacientes portadores da DP (Mogi *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 2002). A expressão da proteína Bcl2 é alta e ubíqua no SNC durante o desenvolvimento nervoso, porém sua expressão cai acentuadamente após o nascimento (Singh e Dikshit, 2007). Estudos em modelos animais demonstraram que camundongos nocaute para o gene codificador da proteína pró-apoptótica Bax apresentaram resistência à toxicidade induzida por MPTP, quando comparados com animais selvagem (*wild-type*) (Vila e Przedborski, 2003). De maneira análoga, o aumento da expressão da proteína Bcl2 foi capaz de promover o bloqueio do

efeito neurotóxico induzido pelo MPP⁺, que notadamente é um indutor da ativação de caspases (Yang *et al.*, 1998).

Outras evidências apontam na mesma direção, ou seja, animais transgênicos expressando a forma humana da proteína Bcl2 em seus neurônios, permanecem protegidos do insulto neurotóxico promovido pelo MPTP, enquanto que os níveis estriatais de DA são reduzidos a cerca de 30% do normal em animais selvagens (Offen *et al.*, 1998).

O conjunto de evidências da literatura corrobora os presentes dados apresentados nesse experimento, indicando a importância do papel da Bcl2 para a neuroproteção no modelo animal da DP induzido por MPTP. Dentro desse contexto é possível sugerir que o 7-NI foi capaz de promover a indução do aumento de expressão da proteína Bcl2 nos neurônios da SNpc, sendo que esse evento, por sua vez, seria o gerador da neuroproteção induzida pelo inibidor da NOSn. Essa condição de neuroproteção pôde ser verificada comportamentalmente através de todos os parâmetros motores observados no teste do campo aberto no período de 24 h após a administração do MPTP. Essa resposta motora indicou que os animais do grupo MPTP + 7NI não manifestaram os mesmos prejuízos motores apresentados pelo grupo MPTP + veículo.

O NO tem sido descrito como um mediador tanto da iniciação de eventos pró- e anti-apoptóticos no encéfalo (Kim *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2002). Evidências substanciais demonstram o envolvimento do NO na neurodegeneração dopaminérgica na via nigroestriatal (Zhang *et al.*, 2006). Entretanto, a exata contribuição do NO para os mecanismos que levam a morte neuronal ainda não é conhecida. Esse gás contribui para uma variada gama de

reações não-enzimáticas, como por exemplo, com tióis celulares, metais ou superóxidos, sendo que os produtos formados dessas reações secundárias apresentam diversas atividades biológicas (Lipton *et al.*, 1993; Garthwaite e Boulton, 1995; Stamler, 1995; Zhang e Snyder, 1995). Tais circunstâncias indicam um potencial neurotóxico mediado pelas cascatas de eventos pelas quais o NO pode se envolver.

Outro provável mecanismo para a citotoxicidade do NO ocorre devido à combinação com o radical heme presente em várias enzimas. Essas reações podem acarretar no bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial e conseqüente morte celular (Brown e Borutaire, 2004). Além disso, também descreve-se que pode ocorrer danos ao DNA e modificações irreversíveis em proteínas, tais como a nitração de resíduos de tirosina ou oxidação de tióis, que são mecanismos patogênicos comuns em diversas doenças neurodegenerativas (Schopfer *et al.*, 2003).

De acordo com os resultados aqui apresentados, não identificou-se indução da expressão da enzima NOSn nos neurônios dopaminérgicos, mediante administração intranigral de MPTP. Tal fato pode ter sido em decorrência da própria lesão neuronal, ou seja, com a morte dos neurônios da SNpc seria pouco provável detectar quantidades apreciáveis de NOSn. Entretanto, o tratamento com 7-NI promoveu uma proteção desses neurônios por parte da lesão impingida pelo MPTP, mas nem dessa forma foi possível identificar um aumento na expressão da enzima NOSn. Esses resultados indicam que essa enzima não apresenta sua expressão induzida pelo MPTP nesse período de 24 após sua infusão. Dessa forma sugere-se que os eventos que envolvem ou necessitam da mediação da NOSn, no modelo animal da DP

induzido por MPTP, ocorram em períodos mais tardios, não estando portanto ligados ao início da neurodegeneração.

De maneira geral, os resultados apontam para um papel desempenhado pela inibição da NOSn proporcionando um aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl2 resultando em neuroproteção. Porém, sabe-se que o 7-NI é uma droga que apresenta um efeito não-seletivo tanto para inibir a NOSn quanto para inibir a enzima MAO-B (Castagnoli *et al.*, 1997, Di Monte *et al.*, 1997, Watanabe *et al.*, 2004). Dessa forma é possível inferir que os efeitos observados até então possam ser também fruto da inibição da MAO-B. Tendo em vista isso, utilizou-se uma outra droga (pargilina) capaz de inibir seletivamente apenas a enzima MAO-B (Watanabe *et al.*, 2004), podendo-se assim isolar a origem do efeito neuroprotetor.

Os resultados referentes ao emprego da pargilina indicaram haver um efeito neuroprotetor de igual magnitude àquele observado quando utilizou-se o 7-NI. Com isso, é possível sugerir que o efeito neuroprotetor observado por intermédio do 7-NI também ocorreu em decorrência da inibição da MAO-B. Tal inferência aponta para a existência de uma combinação de eventos moleculares que ao se somarem desencadeiam eventos de morte neuronal.

Os modelos animais da DP, em especial o modelo induzido por MPTP, apresentam como maior característica a versatilidade, podendo trazer inúmeras respostas de como os neurônios reagem frente a diferentes condições experimentais. Esse experimento forneceu informações sugerindo a importância do papel da proteína Bcl2 como agente neuroprotetor no modelo animal induzido por MPTP. Além disso, mostrou-se que esse fator anti-apoptótico é fortemente induzido pela inibição da NOSn através do 7-NI. Por

fim, verificou-se que o efeito de neuroproteção desencadeado pelo 7-NI também pode acontecer em decorrência da ação dessa droga (inibição) sobre a enzima MAO-B, sugerindo que o 7-NI possui um mecanismo de ação duplo. Inibidores da NOS parecem apresentar um papel imperativo na terapêutica da DP, sendo que diversos resultados presentes na literatura apontam para a existência de diversos mecanismos interconectados que explicariam esses efeitos neuroprotetores advindos da inibição da NOS (Singh e Dikshit, 2007). Os presentes achados inferem que possivelmente num futuro próximo essas drogas (inibidores da NOS e da MAO-B) possam ser consideradas como drogas promissoras na terapêutica anti-neurodegenerativa da DP.

5.2. EXPERIMENTO 2 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares da infusão intranigral de L-DOPA no modelo da DP induzido por MPTP em ratos.

Os resultados desse experimento demonstraram que uma única administração intranigral de L-DOPA foi capaz de promover destruição dopaminérgica nigroestriatal similar àquela provocada pelo MPTP. Esse achado repercutiu em todos os parâmetros comportamentais motores, que mostraram-se prejudicados. Porém, a infusão intranigral de L-DOPA realizada logo após a infusão de MPTP exerceu um efeito modulatório que refletiu sobre a morte neuronal, expressão da TH, comportamento motor e sobre a neurotransmissão dopaminérgica. Além disso, as análises da expressão da TH mostraram que a L-DOPA causou uma redução na expressão dessa proteína na SN, mas não no estriado, de uma maneira muito similar à ocasionada pela

infusão intranigral de MPTP. Mais ainda, a administração combinada de MPTP e L-DOPA resultou numa redução relevante de neurotoxicidade sobre a expressão da TH na SN, opondo-se ao efeito observado quando MPTP ou L-DOPA foram administrados isoladamente.

A L-DOPA é a droga mais comumente prescrita para o tratamento sintomatológico da DP. Apesar disso, essa droga apresenta uma séria limitação em decorrência de seu mecanismo de ação que depende da integridade de um determinado montante de neurônios aptos a converterem esse precursor em DA. Infelizmente, a L-DOPA assim como outras drogas anti-parkinsonianas são ineficazes para impedir o progresso da neurodegeneração (van Vliet *et al.*, 2007). Além disso, recentemente têm-se intensificado o conceito de que a L-DOPA pode produzir neurotoxicidade dopaminérgica (Bendir *et al.*, 2006). Embora não haja um consenso sobre como explicar a neurotoxicidade produzida pela L-DOPA, algumas hipóteses podem ser sugeridas. Um fato confirmado é a ocorrência de biotransformação de L-DOPA em DA a partir da infusão de L-DOPA diretamente na SN (Sarre *et al.*, 1998). Conseqüentemente tem-se postulado que altas concentrações de DA biosintetizada podem acarretar em graves efeitos colaterais em pacientes com DP (Miyawaki *et al.*, 1997). Há relatos clínicos mostrando que aproximadamente 50% dos pacientes desenvolvem complicações motoras cinco anos após o início da terapia com L-DOPA, esse número aumenta para aproximadamente 70% após 15 anos de tratamento (Miyawaki *et al.*, 1997). A incidência de tais problemas motores alcança quase 100% dos pacientes que desenvolveram a forma juvenil da doença (Quinn *et al.*, 1987; Golbe, 1992; Schrag e Quinn, 2000; Thobois *et al.*, 2005).

A análise das latências para o início do movimento revelou que a L-DOPA causou aumento semelhante nesse parâmetro de modo análogo ao MPTP. Essa latência aumentada pode ser relacionada a uma manifestação de bradicinesia, que é repetidamente experimentada por pacientes portadores da DP (Sedelis *et al.*, 2001). O grupo MPTP + L-DOPA manifestou aproximadamente o mesmo perfil para o parâmetro de latência que o grupo tratado apenas com L-DOPA. Nesse sentido, é possível sugerir que o tratamento intranigral com L-DOPA, imediatamente após a lesão com MPTP, resultou em padrões motores distintos para os grupos MPTP + L-DOPA e L-DOPA.

Uma situação similar de respostas foi observada em relação ao parâmetro de frequência de locomoção. Os grupos L-DOPA, MPTP e MPTP + L-DOPA apresentaram reduções significativas na frequência de locomoção em comparação aos grupos controle e sham. Entretanto, a hipocinesia observada nos dois grupos administrados com L-DOPA configura-se como uma forte característica presente num modelo animal da DP. Esse tipo de achado reforça a hipótese de que a L-DOPA conduz a padrões de modulação dopaminérgica. Além disso, o parâmetro de frequência de levantar mostrou-se reduzido para os três grupos experimentais, quando comparados aos grupos controle e sham. Concomitantemente, o tempo de imobilidade foi o único parâmetro comportamental encontrado em que a L-DOPA sozinha promoveu um efeito semelhante ao gerado pelo MPTP. Esses resultados corroboram a possível ocorrência da indução de um prejuízo motor induzido pela L-DOPA.

Analogamente a lesão impingida pelo MPTP, a L-DOPA também produziu uma diminuição significativa no número de neurônios TH-ir na SNpc,

porém tal efeito atingiu menor magnitude que àquele induzido por MPTP. A despeito desse demonstrado potencial neurotóxico da L-DOPA, observado *in vivo*, verificou-se que esse precursor da DA produziu morte neuronal em menor magnitude quando comparado ao MPTP. A administração combinada de MPTP e L-DOPA produziu morte neuronal muito parecida com a observada apenas com MPTP. Nesse contexto não foi detectada nenhuma propriedade da L-DOPA compatível com um efeito de proteção dos neurônios dopaminérgicos frente ao insulto neurotóxico.

Os resultados envolvendo a expressão da enzima TH mostraram que essa proteína não foi alterada no estriado, por meio dos tratamentos farmacológicos. Essa resposta é consistente com os achados de Holmer e colaboradores (2005) que não reportaram alterações na densidade relativa de fibras estriatais TH-ir em grupos de camundongos C57BL6/J tratados com a combinação de MPTP e L-DOPA (via i.p.) em comparação ao grupo tratado apenas com MPTP. Esse fato sugere que a L-DOPA potencialmente não interfere na densidade das fibras dopaminérgicas estriatais. Entretanto, é possível que em períodos posteriores de observação uma condição de redução de expressão da proteína TH possa ser encontrada. Em contraste a ausência de alteração de expressão da TH no estriado, detectou-se uma redução significativa da expressão da TH na SN dos grupos L-DOPA e MPTP, sugerindo a existência de um dano na via nigroestriatal.

Surpreendentemente, o grupo MPTP + L-DOPA não apresentou redução na expressão da enzima TH na SN. Dessa forma, o conjunto de evidências apresentados até então sugere a possível existência de diferentes padrões de efeitos modulatórios gerados pela L-DOPA sobre a via nigroestriatal. Esse fato

intrigante aponta para a ocorrência de eventos de plasticidade neuronal desencadeadas pela L-DOPA quando administrada subsequente ao MPTP. Esse dado contrasta-se com os resultados apresentados na literatura que descreveram que a L-DOPA parece aumentar a degeneração neuronal em animais que apresentaram a função dopaminérgica comprometida pelo uso de neurotoxinas (Steece-Collier *et al.*, 1990; Steece-Collier *et al.*, 1995; Myers *et al.*, 1999; Holmer *et al.*, 2005). Em termos neuroquímicos, entretanto, as análises das concentrações de DA e seus metabólitos (HVA e DOPAC) no estriado demonstraram que a L-DOPA foi capaz de reduzir os níveis estriatais desse neurotransmissor, sugerindo um possível efeito neurotóxico produzido pela L-DOPA. A administração intranigral de MPTP gerou uma redução de DA estriatal semelhante à gerada pela própria L-DOPA, porém com um aumento da taxa de renovação (*turnover*) do neurotransmissor, fato não observado quando a L-DOPA foi administrada isoladamente ou em associação com o MPTP.

O metabolismo da L-DOPA e da DA produz quinonas, semiquinonas, peróxido de hidrogênio e outros radicais livres, que por sua vez acreditam-se serem tóxicos para os neurônios dopaminérgicos (Fahn e Cohen, 1992). Dessa forma, a administração exógena de L-DOPA aumenta significativamente a formação desses metabólitos (Fisher *et al.*, 2000). Esse fato pode indicar que a infusão intranigral de L-DOPA, muito embora, segundo a avaliação neuroquímica, não tenha causado aumento nos níveis de DA ou de seus metabólitos no estriado, possa causar a formação de outras espécies potencialmente neurotóxicas. Outro aspecto relevante leva em conta que altas doses de L-DOPA não são necessariamente acompanhadas por aumentos

significativos dos níveis de DA extracelular, portanto, os efeitos observados devem ser devidos a estimulação direta dos receptores dopaminérgicos pela própria L-DOPA (Fisher *et al.*, 2000). Por outro lado, a redução da neurotoxicidade observada no grupo MPTP + L-DOPA possa ter ocorrido em virtude de uma possível competição dessas moléculas pela enzima MAO-B, que por sua vez metaboliza ambos.

Os presentes resultados sugerem a hipótese de que a L-DOPA pode acelerar a degeneração dopaminérgica, demonstrando um papel dual, ou seja, melhorando os sintomas motores embora possa acelerar o processo neurodegenerativo da doença. Por outro lado, alguns resultados apontam para um aumento na expectativa de vida de pacientes usuários de L-DOPA (Rajput, 2001).

Discute-se que os receptores dopaminérgicos seriam passíveis de estimulação por diferentes compostos em diferentes concentrações: DA sozinha em baixas concentrações, L-DOPA em diferentes doses e por uma combinação de DA e L-DOPA em altas concentrações (Gross *et al.*, 2003). Por outro lado, sabe-se que a L-DOPA em baixas concentrações exerce efeito trófico (Storch *et al.*, 2000), entretanto, também se relatou a existência de toxicidade dose-dependente, mediada por esse precursor da DA, em culturas de neurônios mesencefálicos (Müller *et al.*, 2004).

Após o tratamento com L-DOPA, um aumento posterior de DA estriatal pode ocorrer (Bamford *et al.*, 2004), podendo ativar os receptores dopaminérgicos D₂, pré-sinápticos, colocalizados com terminações glutamatérgicas (Sesack *et al.*, 1994; Wang e Picket, 2002), podendo resultar assim num acréscimo de glutamato extracelular e possível excitotoxicidade

(Holmer *et al.*, 2005). Também é sugerido que os efeitos advindos da L-DOPA sobre a SN de pacientes normais seja diferente daquele observado sobre a SN de pacientes com DP, ou seja, a toxicidade seria intensificada mediante uma situação de dano neuronal já instalado (Rajput, 2001). Essa situação reflete a habilidade da droga em reverter os sintomas motores quando o paciente ainda encontra-se na fase inicial da doença.

Coletivamente os presentes dados vão ao encontro de estudos anteriores (Gross *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2004; Guigoni *et al.*, 2005; Bendir *et al.*, 2006; Konitsiotis e Tsironis, 2006) que indicam que a L-DOPA é capaz de induzir prejuízos sobre o sistema dopaminérgico. Em contraste, os resultados demonstraram que a administração intranigral de L-DOPA subsequente ao MPTP apresentou também uma ação compensatória frente aos efeitos dessa neurotoxina. Isso pode explicar a compensação no comportamento motor, bem como o aumento na expressão da TH em comparação aos grupos MPTP e L-DOPA. Porém, ainda assim os animais que receberam as administrações intranigrais de L-DOPA, manifestaram um comportamento típico de lesão da via nigroestriatal. Os presentes resultados indicam um cenário em que o efeito da L-DOPA pode estar associado a uma ação compensatória ou até mesmo neuroprotetora, dependendo do contexto em que é empregada.

Em conclusão, os resultados desse experimento demonstraram que a administração de L-DOPA foi capaz de gerar morte de neurônios dopaminérgicos similar àquela provocada pelo MPTP. Além disso, a administração concomitante de MPTP e L-DOPA resultou em compensação dos efeitos de prejuízo motor, porém não devido ao aumento dos níveis de DA estriatal (pela L-DOPA) e conseqüente aumento da expressão da TH. Esses

resultados fornecem evidências da existência de um papel dual exercido pela L-DOPA, que pode ser classificado como neurotóxico ou neuroprotetor, dependendo do grau de integridade da via nigroestriatal, dose e tempo de tratamento com esse agente antiparkinsoniano.

5.3. EXPERIMENTO 3 - Investigação dos efeitos comportamentais e moleculares de repetidas administrações de MPTP intranigral em ratos.

Exposições agudas e subcrônicas de camundongos e primatas ao MPTP resultam invariavelmente em morte de neurônios dopaminérgicos então residentes na via nigroestriatal (Eidelberg *et al.*, 1986). Esse tipo de modelo animal, por sua vez, possui como característica provocar a perda neuronal de maneira abrupta, e que eventualmente acarreta numa recuperação do sistema dopaminérgico ao longo do tempo (Petroske *et al.*, 2001). Nesse sentido, observa-se a existência de um paradigma no âmbito da exposição prolongada ou crônica do animal à neurotoxina, que pode produzir efeitos a longo prazo e de natureza progressiva, em relação a morte dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Petroske *et al.*, 2001; Meredith *et al.*, 2002). Devido ao caráter crônico e progressivo da DP, é desejável que modelos animais apresentem como característica principal a capacidade de replicar a perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, também de forma crônica e progressiva (Drolet *et al.*, 2004).

O presente experimento visou examinar as alterações motoras (que são de caráter dopaminérgico), bem como a expressão da enzima TH (passo limitante da biossíntese de DA) e o número de neurônios TH-ir residentes na

SNpc advindos de um novo protocolo experimental proposto como modelo animal da DP. Esse modelo baseou-se em administrações repetidas intranigrais da neurotoxina MPTP, divididas em intervalos de três dias entre as infusões. A determinação desse intervalo de três dias baseou-se em resultados que levam em conta a plasticidade do sistema dopaminérgico, em termos de recuperação do prejuízo motor infringido através de uma única infusão intranigral de MPTP (Lima *et al.*, 2006). Esse protocolo experimental proposto teve como objetivo gerar um modelo animal capaz de mimetizar de maneira mais fiel as alterações progressivas encontradas na DP.

Entretanto, já se tem descrito um outro modelo que se baseia no princípio da utilização de administrações repetidas de neurotoxina (Yazdani *et al.*, 2006). Nesse experimento, demonstrou-se que as administrações de MPP⁺ em ratos atingiram um máximo de 65% de morte neuronal, juntamente com a formação de estruturas similares aos CL. Essa interessante abordagem foi alcançada através de um protocolo com 28 dias de administrações sistêmicas de MPP⁺ através de uma bomba peristáltica implantada no dorso dos animais. Entretanto, apesar de todo o cuidado em se gerar uma neurodegeneração progressiva, não reportou-se um prejuízo motor compatível com a DP (Yazdani *et al.*, 2006).

Os presentes resultados demonstraram que o protocolo proposto gerou uma marcada depleção dos neurônios dopaminérgicos presentes na SNpc imediatamente após a primeira administração de MPTP, perdurando até o último tempo de observação. Nesse sentido, foi possível observar um padrão constante de morte neuronal ao longo das administrações repetidas de MPTP, indicando uma ausência de efeito sinérgico ou acumulativo por parte das doses

da neurotoxina. Dessa forma os resultados indicam que não houve progressão da neurodegeneração, uma vez que essa permaneceu constante ao longo dos períodos de experimentação.

Todavia, o protocolo aqui demonstrado opõe-se a outros apresentados na literatura (Petroske *et al.*, 2001; Meredith *et al.*, 2002) que propõem dez doses de MPTP administradas sistemicamente (25 mg/kg) em combinação com a droga probenecide (inibidor do *clearance* e da excreção renal do MPTP). Essa oposição se faz no sentido de promover um protocolo com a administração intranigral, portanto necessitando de doses significativamente reduzidas, além de abolir o uso de adjuvantes. Tais mudanças garantem menor influência de outros fatores ao modelo, bem como reduzem o tempo de manipulação da neurotoxina pelo experimentador. Além disso, é possível inferir que o protocolo aqui apresentado provou ser satisfatório para a geração de prejuízos motores, o que em nossa perspectiva é uma característica fundamental para um modelo reprodutível da DP.

Em relação as observações comportamentais, para a análise dos efeitos motores gerados pela lesão nigroestriatal, examinou-se a distância de locomoção, a velocidade média de ambulação e as trajetórias obtidas ao longo dos diferentes tempos de observação, no campo aberto. A primeira infusão de MPTP resultou numa redução da distância de locomoção, bem como da velocidade média dos animais, logo no primeiro dia após a primeira infusão. Em contraste, três dias após a primeira infusão, detectou-se que os parâmetros motores foram restaurados a níveis comparáveis aos dos grupos controle e sham. Já a segunda e a terceira infusões induziram a um estado de hipolocomoção irreversível, verificado até o final do experimento. Esses

resultados sugerem que os neurônios dopaminérgicos residentes na SNpc apresentam uma plasticidade relativa, que foi capaz de compensar apenas o primeiro insulto neurotóxico (Lima *et al.*, 2006; Reksidler *et al.*, 2007). Além disso, quando esses neurônios foram consecutivamente afetados pelos insultos neurotóxicos induzidos pelo MPTP, detectou-se uma redução drástica da capacidade compensatória dessas células. Esse fato resultou em um prejuízo motor prolongado, que pôde ser visualizado pelos resultados comportamentais.

De acordo com os dados apresentados até então viu-se necessário esclarecer o possível mecanismo pelo qual ocorre essa capacidade plástica presente na população de neurônios dopaminérgicos remanescentes da lesão. Nesse sentido, buscou-se acessar a enzima TH, que por sua vez é fundamental para o delineamento de mecanismos motores gerados pelo sistema dopaminérgico (Blandini *et al.*, 2000; Ferraz *et al.*, 2003). Os resultados demonstraram que a expressão da enzima TH apresentou-se reduzida logo no primeiro tempo de observação, após a primeira administração de MPTP. Essa alteração molecular manteve-se até o último período de observação experimental (três dias após a terceira infusão).

A suscetibilidade da expressão da enzima TH durante a exposição ao MPTP constitui-se como uma característica importante do modelo animal, que por sua vez não deve ser unicamente ditada pela morte dos neurônios dopaminérgicos nigrais. Esses resultados sugerem que distúrbios intrínsecos envolvendo o metabolismo neuronal do balanço MPTP/MPP⁺ devam induzir uma redução da expressão da enzima TH, numa tentativa de evitar uma “superprodução” compensatória de DA, que poderia levar a um aumento potencial do estresse oxidativo.

Uma característica importante do modelo que utiliza infusões individuais de MPTP intranigral é a ocorrência de um prejuízo motor fugaz que muitas vezes é revertido a níveis similares aos dos controles em apenas três dias após sua administração, mesmo a despeito da proeminente lesão de cerca de 50% dos neurônios nigroestriatais. Uma possível explicação para esse resultado recai sobre a participação da via do mesoaccumbens sobre a modulação da atividade motora. Sabe-se que o núcleo accumbens, com sua densa inervação dopaminérgica, medeia a resposta comportamental de sensibilização de estado, um processo chave para a droga adição (Bjijou *et al.*, 2002). Entretanto, repetidas injeções de anfetamina diretamente no núcleo accumbens aumentam a atividade motora, sendo que não é possível sensibilizar esse tipo de comportamento (Vezina, 1993; Cador *et al.*, 1995). Além disso, evidências recentes têm lançado luz sobre a questão de haver uma influência exercida pelo mesoaccumbens sobre a resposta motora como sendo dependente do grau do tônus dopaminérgico como um fator necessário para a expressão de uma total magnitude de ativação motora (Sotnikova *et al.*, 2005).

O modelo aqui demonstrado propôs gerar um consistente e irreversível prejuízo motor (dentro do contexto experimental), além de uma provável neurodegeneração progressiva, compatível com as características fisiopatológicas da DP. Considerando a morte neuronal, os resultados indicaram que não foi possível produzir uma neurotoxicidade sinérgica ou acumulativa sobre os neurônios dopaminérgicos. De acordo com Fornai e colaboradores (2005), infusões contínuas de MPTP causaram menor toxicidade aguda devido à formação de um baixo pico de concentração de MPP⁺. Por

outro lado, esse tipo de abordagem produziu prejuízos crônicos aos neurônios dopaminérgicos da SNpc e noradrenérgicos do *locus coeruleus*.

Apesar da ausência de neurodegeneração progressiva, prejuízos motores foram claramente alcançados através das repetidas infusões, principalmente após a segunda, o que subsequente provocou um prejuízo irreversível nos parâmetros de distância percorrida e velocidade média de ambulação. Sugerimos que essa resposta comportamental tenha ocorrido não apenas em resposta a redução no número de neurônios e conseqüentemente na redução da aferência dopaminérgica para o estriado, mas também em virtude da maciça e constante redução da expressão da enzima TH na SN. Esse evento é sugestivo de um importante efeito mediado pelo MPTP sobre a expressão dessa enzima, que por sua vez mimetiza a DP de uma maneira mais precisa do que apenas com o uso de uma administração única da neurotoxina.

Em resumo, os presentes resultados demonstraram que uma resposta de prejuízo motor persistente foi alcançada com o protocolo aqui proposto. Entretanto, detectou-se uma redução de 50% no número de neurônios TH-ir na SNpc logo no primeiro tempo de observação, sendo que essa porcentagem de morte neuronal não se alterou ao longo das administrações da neurotoxina. Paralelamente, a expressão da proteína TH mostrou-se reduzida após a administração da neurotoxina, revelando-se como um importante alvo para o MPTP. Tal evento sugere que a TH caracteriza-se como um ponto fundamental para o comportamento motor, mais até do que meramente o número de neurônios TH-ir.

Sugere-se ainda, que os neurônios dopaminérgicos nigroestriatais apresentam uma importante capacidade compensatória, uma vez que esses neurônios não exibiram um padrão de morte neuronal progressivo quando o MPTP foi repetidamente administrado. Nesse sentido o modelo aqui proposto falhou em mimetizar a DP, porém foi bem sucedido em prover novos conhecimentos relevantes sobre o padrão de expressão da enzima TH na via nigroestriatal e prejuízos motores irreversíveis.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tomados em conjunto os experimentos realizados nesta tese fornecem evidências adicionais sobre o processo de morte neuronal no modelo do MPTP em ratos. Sob o ponto de vista molecular e farmacológico os resultados indicaram que a administração de 7-NI preveniu a neurotoxicidade gerada pelo MPTP neste modelo animal da DP, principalmente por inibir a NOSn e conseqüentemente aumentar a expressão da proteína Bcl2. Entretanto, detectou-se que o efeito de inibição da MAO-B também contribuiria para esse papel neuroprotetor do 7-NI, haja vista os efeitos observados em decorrência do tratamento com pargilina.

O segundo experimento demonstrou que a administração intranigral de L-DOPA acarretou um importante efeito neurotóxico sobre os neurônios dopaminérgicos, fato que por si só apresenta grande significado em virtude do emprego dessa droga na terapêutica. Porém, a administração concomitante de MPTP e L-DOPA não apresentou efeito sinérgico sobre a morte neuronal quando comparado aos grupos que receberam as drogas isoladamente. Dessa forma sugere-se que possa ter ocorrido uma competição pela enzima MAO-B, que então metabolizaria MPTP e L-DOPA mais vagarosamente, portanto acarretando numa menor neurodegeneração. A saturação enzimática também parece ser a razão pela qual o tratamento com repetidas administrações de MPTP intranigral não causou um efeito neurotóxico sinérgico sobre os neurônios dopaminérgicos.

Os presentes achados trazem como perspectivas à identificação de alvos farmacológicos chave tais como as proteínas Bcl2, NOSn e MAO-B, que

desempenham papel fundamental sobre a viabilidade dos neurônios dopaminérgicos frente a condições adversas impostas por neurotoxinas como o MPTP. Sugere-se então que a modulação dessas proteínas possa ser capaz de produzir os tão desejáveis efeitos neuroprotetores na DP. Não obstante aos potenciais novos alvos terapêuticos, verificou-se que a L-DOPA é potencialmente capaz de produzir processos neurodegenerativos, evento que implica em inúmeras repercussões a respeito do seu uso terapêutico. Considerando o novo protocolo de modelo animal apresentado, propõe-se que essa contribuição fornecerá novas ferramentas experimentais para que seja possível testar abordagens terapêuticas, haja vista principalmente as alterações motoras mimetizadas por esse modelo.

Em suma, os resultados aqui apresentados configuram-se como fontes para o esclarecimento de novos sítios de intervenção farmacológicos, permitindo o descobrimento de terapêuticas mais apropriadas no tratamento de pacientes parkinsonianos ou ainda colaborando com o entendimento dos processos de neurodegeneração. Um resumo das interações desses processos está esquematicamente representado na Figura 26.

7. CONCLUSÕES

- O tratamento com 7-NI revelou-se neuroprotetor frente à lesão induzida por MPTP. Esse efeito seria em decorrência da inibição da MAO-B ou devido ao aumento da expressão da proteína Bcl2 que se co-localizou com os neurônios dopaminérgicos residentes na SNpc. Possibilitando de um efeito sinérgico entre os dois mecanismos.
- A administração intranigral de L-DOPA foi capaz de promover uma neurotoxicidade aguda sobre os neurônios dopaminérgicos, semelhante à observada pelo MPTP. Entretanto, a administração concomitante de MPTP e L-DOPA não resultou em neurotoxicidade evidenciada pelo aumento da expressão da TH na SN.
- Não detectou-se efeito sinérgico ou acumulativo por parte do MPTP nos neurônios dopaminérgicos ao longo das repetidas infusões, levando a uma ausência de um processo progressivo de neurodegeneração. Diferente disso observou-se um efeito compensatório por parte dos neurônios dopaminérgicos. Paralelamente, a enzima TH mostrou-se um importante alvo para o MPTP, apresentando sua expressão reduzida ao longo de todos os tempos de observação.

8. REFERÊNCIAS

Abou-Sleiman P.M., Muqit M.M.K., Wood N.W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci*, 7, 207-219, 2006.

Askenasy J.J. Trying to understand sleep in Parkinson's disease patients. *Sleep Biol Rhythms*, 110, 125-150, 2005.

Aubin N., Curet O., Deffois A., Carter C. Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *J Neurochem*, 71, 1635-1642, 1998.

Ballard P.A. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology*, 35, 949-956, 1985.

Bamford N.S., Robinson S., Palmiter R., Joyce J.A., Moore C., Meshul C.K. Presynaptic modulation of corticostriatal terminals in dopamine-deficiency. *J Neurosci*, 24, 9541-9552, 2004.

Battisti C., Formichi P., Radi E., Federico A. Oxidative-stress-induced apoptosis in PBLs of two patients with Parkinson disease secondary to alpha-synuclein mutation. *J Neurol Sci*, 267, 120-124, 2008.

Barnham J.K., Masters A.B., Bush A. Neurodegenerative disease and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 205-214, 2004.

Barthwal M.K., Srivastava N., Shukla R., Nag D., Seth P.K., Srimal R.C., Dikshit M. Polymorphonuclear leukocyte nitrite content and antioxidant enzymes in Parkinson's disease patients. *Acta Neurol Scand*, 100, 300-304, 1999.

Barthwal M.K., Srivastava N., Dikshit M. Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. *Redox Rep*, 6, 297-302, 2001.

Blandini F., Nappi G., Tassorelli C., Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*, 62, 63-88, 2000.

Bendir G., Özekmekçi S., Apaydin H., Delil S., Erginöz E. A hospital-based study: Risk factors in development of motor complications in 555 Parkinson's patients on levodopa therapy. *Clin Neurol Neurosurg*, 108, 726-732, 2006.

Birkmayer W., Riederer P. Die Parkinson-krankheit: biochemie, klinic, therapie, 2. Aufl. Springer, Wien, 60 -101, 1985.

Bijjou Y., De Deurwaerdere P., Spampinato U., Stinus L., Cador M. DAmphetamine- induced behavioral sensitization: effect of lesioning dopaminergic terminals in the medial prefrontal cortex, the amygdala and the entorhinal cortex. *Neuroscience*, 109, 499-516, 2002.

Bredt D.S., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Trends Cell Biol*, 1, 86, 1991.

Broadhurst P.L. Experiments in psychogenetics. In: Eisenk, H.J. Experiments in personality. London: Routledge & Kegan Paul, 52-71, 1960.

Brown G.C., Borutaite V. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim Biophys Acta*, 1658, 44-49, 2004.

Burch D., Sheerin F. Parkinson's disease. *Lancet*, 365, 622-627, 2005.

Cador M., Bijjou Y., Stinus L. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to AMPH. *Neuroscience*, 65, 385-395, 1995.

Calabrese V. , Mancuso C., Calvani M., Rizzarelli E., Butterfield D. A., A. Stella. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nat Rev Neurosci*, 8, 766-775, 2007.

Calne B. D. Parkinson's disease is not one disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 7, 3-7, 2001.

Castagnoli K., Palmer S., Anderson A., Bueters T., Castagnoli N Jr. The neuronal oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole also inhibits the monoamine oxidase-B-catalyzed oxidation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Chem Res Toxicol* 10, 364-368, 1997.

Chan P., Langston J.W., Irwin I., DeLanney L.E., Di Monte D.A. 2 Deoxyglucose enhances 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse brain. *J Neurochem*, 610-616, 1993.

Chen, H-J., LiuT-Y., Wu C-W., Chi C.-W. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of parkinson's disease. *Arch Neurol*, 60, 1059-1064, 2003.

Choi B.M., Pae H.O., Jang S.I., Kim Y.M., Chung H.T. Nitric oxide as a pro-apoptotic as well as anti-apoptotic modulator. *J Biochem Mol Biol*, 35, 116-126, 2002.

Chung T.H., Pae O.H., Choi M.B., Billar R.T., Kim M.Y. Nitric oxide as a biregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 282, 1075-1079, 2001.

Culmsee C., Mattson M. P. p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 761-777, 2005.

Cutillas B., Espejo M., Gil J., Ferrer I., Ambrosio S. Caspase inhibition protects nigral neurons against 6-OHDA-induced retrograde degeneration. *Neuroreport*, 10, 2605-2608, 1999.

Da Cunha C., Gevaerd M.S., Vital M.A.B.F., Miyoshi E., Andreatini R., Silveira, R., Takahashi R.N., Canteras N.S. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res*, 124, 9-18, 2001.

Da Cunha C., Angellucci M.E.M., Canteras N.S., Wonnacott S., Takahashi R.N. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol*, 22, 227-237, 2002.

Da Cunha C., Wietzikoski S., Wietzikoski E. C., Miyoshi E., Ferro M.M., Anselmo-Franci J.A., Canteras N. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of memory system independent of hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem* 79, 236-242, 2003.

Dauer, W., Kholodilov, N., Vila, M., *et al.* Resistance of α -synuclein null mice to the Parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14524-14529, 2002.

Dauer W., Przedborski S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. *Neuron*, 39, 889-909, 2003.

Dawson, T.M., Dawson, V.L. Rare genetic mutations shed light on the pathogenesis of Parkinson disease. *J Clin Invest*, 111, 145-151, 2003.

Deleu D., Northway M.G., Hanssens Y. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs use in the treatment of Parkinson's Disease. *Clin Pharmacokinetic*, 4, 261-309, 2002.

Di Monte D.A., Royland J.E., Anderson A., *et al.* Inhibition of monoamine oxidase contributes to the protective effect of 7-nitroindazole against MPTP neurotoxicity. *J Neurochem*, 69, 1771-1773, 1997.

Drechsel D.A., Patel M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents 3 implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 44, 1873-86, 2008.

Drolet R.E., Behrouz B., Lookingland K.J., Goudreau J.L. Mice lacking α -synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology*, 25, 761-769, 2004.

Duncan A.J., Heales S.J.R. Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med*, 26, 67-96, 2005.

Eberhardt, O., Schulz, J. B. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Letters*, 139, 135-151, 2003.

Ehringer H., Hornykiewicz O. Distribution of noradrenaline and dopamine (3 hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system. *Klin Wochenschr* 38, 1236-1239, 1960.

Eidelberg E., Brooks B.A., Morgan W.W., Walden J.G., Kokemoor R.H. Variability and functional recovery in the *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. *Neuroscience*, 18, 817-822, 1986.

Emerit J., Edeas M., Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother*, 58, 39-46, 2003.

Eriksen, J.L., Przedborski, S., Petrucelli, L. Gene dosage and pathogenesis of Parkinson's disease. *Trends Mol Med*, 11, 91-96, 2005.

Esposito E., Di Matteo V., Benigno A., Pierucci M., Crescimanno G., Di Giovanni G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 205, 295-312, 2007.

Fahn S. Does levodopa slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *J Neurol*, 252 (Suppl. 4), iv37-iv42, 2005.

Fahn S., Cohen G. The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Ann Neurol*, 32, 804-812, 1992.

Ferraz A.C., Xavier L.L., Hernandez S., Sulzbach M., Viola G.G., Anselmo-Franci J.A., Achaval M., Da Cunha C. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6 hydroxydopamine. *Brain Res*, 986, 200-205, 2003.

Fisher A., Biggs C.S., Eradiri O., Starr M.S. Dual effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine on aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine release on motor stimulation in the reserpine-treated rat: evidence that behavior is dopamine independent. *Neuroscience*, 95, 97-111, 2000.

Fornai F., Schlüter O.M., Lenzi P., Gesi M., Ruffoli R.F., Ferrucci M., Lazzeri G., Busceti C.L., Pontarelli F., Battaglia G., Pellegrini A., Nicoletti F., Ruggieri S.,

Paperelli A., Sudhof T.C. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: Convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 102, 3413-3418, 2005.

Garthwaite J., Boulton C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol*, 57, 683-706, 1995.

Gatto E.M., Carreras M.C., Pargament G.A., Riobo N.A., Reides C., Repetto M., Fernandez Pardal M.M., Llesuv S., Poderoso J.J. Neutrophil function, nitric oxide, and blood oxidative stress in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 11, 261-267, 1996.

Gatto M.E., Riobo A.N., Carreras C.M., Chernavsky A., Rubio A., Satz L.M., Poderoso J.J. Overexpression of neutrophil neuronal nitric oxide synthase in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*, 4, 534-539, 2000.

Gao H., Liu B., Wanggin Z., Jau-Shyong H. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 395-400, 2003.

Gelb D.J., Oliver E., Gilman S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*, 56, 33-39, 1999.

Gerlach M., Riederer P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*, 103, 987-1041, 1996.

Giulivi C., Kato K., Cooper C.E. Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption I: cellular physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1225-C1231, 2006.

Golbe L.I. Young-onset Parkinson's disease: a clinical review. *Neurology*, 41, 168-173, 1992.

Gomes M.Z., Bel E.A. Del. Effects of eletrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. *Brain Res Bull*, 62, 107-115, 2003.

Gomes M.Z., Raisman-Vozari R., Bel E.A. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res*, 1203, 160-169, 2008.

Gorell J.M., Peterson E.L., Rybicki B.A., Johnson C.C. Multiple risk factors for Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci*, 217, 169-174, 2004.

Green D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell*, 121, 671-674, 2005.

Gross C.E., Ravenscroft P., Dovero S., Jaber M., Bioulac B., Bezard E. Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice. *J Neurochem*, 84, 1246-1255, 2003.

Guigoni C., Dovero S., Aubert I., Li Q., Bioulac B.H., Bloch B., Gurevich E., Gross C.E., Bezard E. Levodopa-induced dyskinesia in MPTP-treated macaques is not dependent on the extent and pattern of nigrostriatal lesioning. *Eur J Neurosci*, 22, 283-287, 2005.

Hald A., Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: Is there a casual link? *Experim Neurol*, 184, 561-564, 2005.

Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*, 84, 153-166, 2002.

Hartmann A., Mouatt-Prigent A., Faucheux B.A., Agid Y., Hirsch E.C. FADD: A link between TNF family receptors and caspases in Parkinson's disease. *Neurology*. 58, 308-310, 2002.

He Y., Imam S.Z., Dong Z., Jankovic J., Ali S.F., Appel S.H., Le W. Role of nitric oxide in rotenone-induced nigrostriatal injury. *J Neurochem*, 86, 1338-1345, 2003.

Heales S.J.R., Bolaños J.P., Stewart V.C., Brookes P.S., Land J.M., Clark J.B. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta*, 2, 215-228, 1999.

Heneka M.T., Dumitrescu L., Loschmann P.A., Wullner U., Klockgether T. Temporal, regional, and cell-specific changes of iNOS expression after intra-striatal microinjection of interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Chem Neuroanat*, 18, 167-179, 2000.

Holmer H.K., Keyghobadi M., Moore C., Meshul C.K. L-Dopa-induced reversal in striatal glutamate following partial depletion of nigrostriatal dopamine with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neuroscience*, 136, 333-341, 2005.

Hunot S., Boissiere F., Faucheux B., Brugg B., Mouatt-Prigent A., Agid Y., Hirsch E.C. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-363, 1996.

Iravani M.M., Kashafi K., Mander P., Rose S., Jenner P. Involvement of inducible nitric oxide synthase in inflammation-induced dopaminergic neurodegeneration. *Neuroscience*, 110, 49-58, 2002.

Jenner P., Olanow C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology*, 47, S161-S170, 1996.

Jenner P. Preclinical evidence for neuroprotection with monoamine oxidase-B inhibitors in Parkinson's disease. *Neurology*, 63, S13-S22, 2004.

Kim M.K.P., Zamora R., Petrosko P., Billar R.T. The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol*, 1, 1421-1441, 2001.

Kokoszka, J. E., Coskun P., Esposito L.A., Wallace D.C. Increased mitochondrial oxidative stress in the SOD2 (+/-) mouse results in the age related mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2278-2283, 2001.

Konitsiotis S., Tsironis C. Levodopa-induced dyskinesia and rotational behavior in hemiparkinsonian rats: Independent features or components of the same phenomenon? *Behav Brain Res*, 170, 337-341, 2006.

Koo H-J., Lee H-J., Im H. Sequence determinants regulating fibrillation of human α -synuclein. *Biochem Biophys Res Commun*, 368, 772-778, 2008.

Kostrzewa R.M., Nowak P., Kostrzewa J.P., Kostrzewa R.A., Brus R. Peculiarities of L -DOPA treatment of Parkinson's disease. *Amino Acids*, 28, 157-164, 2005.

Kurkowska-Jastrzębska I., Litwin T., Joniec I. Ciesielska A. Przybylkowski A., Czlonkowski A., Czlonkowska A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. *Exp Neurol*, 150, 50-61, 1999.

Kurkowska-Jastrzębska I., Babiuch M., Joniec I., Przybylkowski A., *et al.* Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. *Int Immunopharmacol*, 2, 1213-1218, 2002.

Lang A., Lozano A.M. Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1044-1053, 1998.

Langston J.W., Ballard P., Tetrud J.W., Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*, 219, 979-80, 1983.

Langston J.W., Irwin I., Langston E.B., Forno L.S. Pargyline prevents MPTP-induced parkinsonism in primates. *Science*, 225, 1480-1482, 1984.

Lev N., Melamed E., Offen D. Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol*, 27, 245-250, 2003.

Lima M.M.S., Reksidler A.B., Zanata S.M., Machado H.B., Tufik S., Vital, M.A.B.F. Different parkinsonism models produce a time dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res*, 1101, 117-125, 2006.

Lipton S.A., Choi Y.B., Pan,Z.H., Chen H.S.V., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel, D.J., Stamler J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and

neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nat Lond*, 364, 626-632, 1993.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin protein reagent. *J Bio Chem*, 193, 265-275, 1951.

Lundblad M., Picconi B., Lindgreen H., Cenci M.A. A model of L-dopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis*, 16, 110-123, 2004.

Maguire-Zeiss K.A., Short D.W., Federoff H.J. Synuclein, dopamine and oxidative stress: co-conspirators in Parkinson's disease? *Brain Res Mol Brain Res*, 134, 18-23, 2005.

Martinez-Ruiz A., Lamas L. S-nitrosylation: a potential new paradigm in signal transduction. *Cardiovasc Res*, 62, 43-52, 2004.

Mayer B., Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells, *Trends Biochem Sci*, 22, 477-481, 1997.

Meredith G.E., Totterdell S., Petroske E., Santa Cruz K., Callison Jr. R.C., Lau Y. Lysosomal malfunction accompanied alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res*, 956, 156-165, 2002.

Miyawaki E., Lyons K., Pahwa R., Troster A.I., Hubble J., Smith D., *et al.* Motor complications of chronic levodopa therapy in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol*, 20, 523-530, 1997.

Mizuno Y. Genetics of Parkinson's disease. *Biomed Pharmacother*, 53, 109-116, 1999.

McGeer P.L., Itagaki S., Boyes B.E., McGeer E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-1291, 1988.

McGeer P.L., McGeer E.G. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 22, 799-809, 2001.

Miyoshi E., Wietzikoski S., Camplessei M., Silveira R., *et al.* Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced nigral lesion. *Brain Res Bull*, 58, 41-47, 2002.

Mladenovic A., Perovic M., Raicevic N., *et al.* 6-Hydroxydopamine increases the level of TNF-alpha and bax mRNA in the striatum and induces apoptosis of dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. *Brain Res*, 996, 237-45, 2004.

Mogi M., Harada M., Kondo T., Riederer P., Inagaki H., Minami M., Nagatsu T. Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth

factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients NeurosciLett, 180,147-150,1994.

Muller T., Hefter H., Hueber R., Jost W.H., Leenders K.L., Odin P., Schwarz J. Is levodopa toxic? J. Neurol, 251, 44-46, 2004.

Myers C.S., Halladay A.K., Widmer D.A., Wagner G. Neurotoxic effects of amphetamine plus L-DOPA. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 731-740, 1999.

Nathan C., Xie Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem, 269, 13725-13728, 1994.

Novikova L., Harris B.L., Garriss D.R., Lau Y.S. Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine/probenecid model of Parkinson's disease. Neuroscience, 140, 67-76, 2006.

Offen D., Beart P.M., Cheung N.S., Pascoe C.J., Hochman A., Gorodin S., Melamed E., Bernard R., Bernard O. Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci U S A, 95, 5789-5794, 1998.

Orr C.F., Rowe D. B., Halliday G.M. An inflammatory review of Parkinson's disease. Prog Neurobiol, 68, 325-340, 2002.

Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press, 2005.

Periquet, M., Latouche, M., Lohmann, E. *et al.* *Parkin* mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. Brain, 126, 1271-1278, 2003.

Perry J. C., Da Cunha C., Anselmo-Franci J., Andreatini R., *et al.* Behavioural and neurochemical effects os phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra in rats. Eur J Pharmacol, 484, 225-233, 2004.

Perry J.C., Hipólido D.C., Tufik S., Martins R.D., Da Cunha C., Andreatini R., Vital M.A.B.F. Intra-nigral MPTP lesion in rats: Behavioral and autoradiography studies. Exp Neurol, 195, 322-329, 2005.

Petroske E., Meredith G.E., Callen S., Totterdell S., Lau Y.S. Mouse model of parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. Neuroscience, 106, 589-601, 2001.

Przedborski S., Lewis V., Naini A.B., Jakowec M., Petzinger G., Miller R., Akram M. The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-

tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem*, 76, 1265-1274, 2001.

Przedborski, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 11, 3-7, 2005.

Przybylkowski A., Kurkowska-Jastrzebska I., Jonie I., Ciesielsk A. Cyclooxygenases mRNA and protein expression in striata in the experimental mouse model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration to mouse. *Brain Res*, 1019, 144-151, 2004.

Quinn N., Critchley P., Marsden C.D. Young-onset Parkinson's disease. *Mov Disord*, 2, 73-91, 1987.

Rajput, A.H. Levodopa prolongs life expectancy and is non-toxic to substantia nigra. *Parkinsonism Relat Disord*, 8, 95-100, 2001.

Ravenstijn P.G.M., Merlini M., Hameetman M., *et al.* The exploration of rotenone as a toxin for inducing Parkinson's disease in rats, for application in BBB transport and PK-PD experiments. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 57, 114-130, 2008.

Reksidler A.B., Lima M.M.S., Zanata S.M., Machado H.B., Da Cunha C, *et al.* The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Clin Pharmacol*, 560, 163-175, 2007.

Rye D.B. Excessive daytime sleepiness and unintended sleep in Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 6, 169-176, 2006.

Royland J.E., Delfani K., Langston J.W., Janson A.M., Monte D.A.D. 7-Nitroindazole prevents 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced ATP loss in the mouse striatum. *Brain Res*, 839, 41-48, 1999.

Sambrook J., Fritsch E. F., *et al.* Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.

Sairam K., Saravanan K., Banerjee R., Mohanakumar K. Non-steroidal anti-inflammatory drug sodium salicylate, but not diclofenac or celecoxib, protects against 1-methyl-4-phenylpyridinium – induced dopaminergic neurotoxicity in rats. *Brain Res*, 966, 245-252, 2003.

Sarre, S., Vandeneede, D., Ebinger, G., *et al.* Biotransformation of L-DOPA to Dopamine in the Substantia Nigra of Freely Moving Rats: Effect of Dopamine Receptor Agonists and Antagonists. *J Neurochem*, 70, 1730-1739, 1998.

Sas K., Robotka H., Toldi J., Vécsei L. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences*. 257, 221-239, 2007.

Schapira A.H.V., Bezard E., Brotchie J., *et al.* Novel pharmacological targets for the treatment of Parkinson's disease. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 845-854, 2006.

Schrag A., Quinn N. Dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease: a community-based study. *Brain*, 123, 2297-2305, 2000.

Schopfer F.J., Baker P.R., Freeman B.A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.* 28, 646-654, 2003.

Sesack S.R., Aoki C., Pickel V.M. Ultrastructural localization of D2 receptor-like immunoreactivity in midbrain dopamine neurons and their striatal targets. *J. Neurosci.* 14, 88-106, 1994.

Sedelis M., Schwarting R. K.W., Huston J.P. Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 125, 109-125, 2001.

Shimohama S., Sawada H., Kitamura Y., Taniguchi T. Disease model: Parkinson's disease. *Trends Mol Med*, 9, 360-365, 2003.

Singh S., Das T., Ravindran A., Chaturvedi K.R., Shukla Y., Agarwal K.A., Dikshit M. Involvement of nitric oxide in neurodegeneration: a study on the experimental models of Parkinson's disease. *Redox Rep*, 10, 103-109, 2005.

Singh S., Dikshit M. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide. *Brain Res Rev*, 54, 233 -250, 2007.

Sotnikova T.D., Beaulieu J-M., Barak L.S., Wetsel W.C., Caron M.G., Gainetdinov R.R. Dopamine-Independent Locomotor Actions of Amphetamines in a Novel Acute Mouse Model of Parkinson Disease. *PLoS Biol*, 3, e271, 2005

Stamler J.S. S-nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. *Curr Top Microbiol Immunol*, 196, 19-36, 1995.

Steece-Collier K., Yurek D.M., Collier T.J., *et al.* Chronic levodopa impairs morphological development of grafted embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol*, 110, 201-208, 1990.

Steece-Collier K., Yurek D.M., Collier T.J., *et al.* The detrimental effect of levodopa on behavioral efficacy of fetal dopamine neuron grafts in rats is reversible following prolonged with-draw of chronic dosing. *Brain Res*, 676, 404-408, 1995.

Storch A., Blessing H., Bareiss M., Jankowski S., Ling Z.D., Carvey P., *et al.* Catechol-O-methyltransferase inhibition attenuates levodopa toxicity in mesencephalic dopamine neurons. *Mol Pharmacol*, 57, 589-594, 2000.

Teismann P., Ferger B. Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Synapse*, 167-174, 2001.

Thobois S., Delamarre-Damier F., Derkinderen P. Treatment of motor dysfunctions in Parkinson's disease: an overview. *Clin Neurol Neurosurg*, 107, 269-281, 2005.

Togo T., Iseki E., Marui W., Akiyama H., Ueda K., Kosaka K. Glial involvement in the degeneration process of Lewy body-bearing neurons and the degradation process of Lewy bodies in brains of dementia with Lewy bodies. *J Neurol Sci*, 184, 71-75, 2001.

Toulouse A, Sullivan AM. Progress in Parkinson's disease-Where do we stand? *Prog Neurobiol. In Press*, 2008.

Valdeoriola F., Nobbe F. A., Tolosa E. Treatment of behavioural disturbances in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 51, 175-204, 1997.

van Vliet S.A.M., Vanwersch R.A.P., Jongsma M. J., Olivier B., Philippens I.H.C.H.M. Therapeutic effects of Δ^9 -THC and modafinil in a marmoset Parkinson model. *Eur Neuropsychopharmacol*, 18, 383-389, 2008.

Vezina P. Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res*, 605, 332-337, 1993.

Vila M., Jackson-Lewis V., Vukosavic S., Djaldetti R., Liberatore G., Offen D., Korsmeyer S.J., Przedborski S. Bax ablation prevents dopaminergic neurodegeneration in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2837-2842, 2001.

Vila M., Przedborski S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4, 365-375, 2003.

Vila, M., Przedborski, S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med*, 10, 58-62, 2004.

Zhang J., Snyder S.H. Nitric oxide in the nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35, 213-233, 1995.

Zhang L., Dawson V.L., Dawson T.M. Role of nitric oxide in Parkinson's disease. *Pharmacol Ther*, 109, 33-41, 2006.

Wang H., Pickel V.M. Dopamine D2 receptors are present in prefrontal cortical afferents and their targets in patches of the rat caudate-putamen nucleus. *J Comp Neurol*, 442, 392-404, 2002.

Watanabe H., Muramatsu Y., Kurosaki R., Michimata M., Matsubara M., Imai Y., Araki T. Protective effects of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in mouse brain against MPTP neurotoxicity: an immunohistological study. *Eur Neuropsychopharmacol*, 14, 93-104, 2004.

Yang L., Matthews R.T., Schulz J.B., Klockgether T., Liao A.W., Martinou J.C., Penney J.B.Jr., Hyman B.T., Beal M.F. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity is attenuated in mice overexpressing Bcl-2. *J Neurosci*, 15, 18, 8145-8152, 1998.

Yazdani U., German D.C., Liang C-L., Manzino L., Sonsalla P.K., Zeevalk G.D. Rat model of Parkinson's disease: Chronic central delivery of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺). *Exp Neurol*, 200, 172-183, 2006.

9. ANEXOS

Repeated intranigral MPTP administration: A new protocol of prolonged locomotor impairment mimicking Parkinson's disease

Angela Braga Reksidler^a, Marcelo Meira Santos Lima^{b,*}, Patrícia Dombrowski^a,
Monica Levy Andersen^b, Sílvia Marques Zanata^c, Roberto Andreatini^a,
Sergio Tufik^b, Maria Aparecida Barbato Frazão Vital^a

^a Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Av. Francisco H. dos Santos s/n,
Jardim das Américas 81531-990, Curitiba, PR, Brazil

^b Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
Rua Napoleão de Barros 925, Vila Clementino 04024-002, São Paulo, SP, Brazil

^c Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

Received 18 June 2007; received in revised form 6 August 2007; accepted 23 August 2007

Abstract

Different Parkinson's disease (PD) animal models reproduce the early phase of the disease, which deny the possible existence of a synergic effect of consecutive insults to the dopaminergic neurons. We proposed a novel protocol of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) nigrostriatal lesion, which consists in repeated MPTP intranigral administrations intending to differentiate effects of a single lesion in relation to repeated lesions. For this purpose, a schedule of 3-day intervals between the MPTP administrations, totalizing 3 infusions in 9 days were adopted. A persistent locomotor deficit was produced after the 2nd infusion, remaining until the last time-point. Tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactive neurons were reduced in 50% 1 day after the 1st infusion and the neuronal loss remained constant even after the 2nd and 3rd MPTP infusions. In parallel, (TH) protein expression in the substantia nigra pars compacta (SNpc) revealed to be a sensitive target for MPTP, once it was found to be down-regulated immediately after the 1st MPTP exposure until the last time-point. These findings corroborate the concept of an early phase model of PD elicited by MPTP even when this neurotoxin was used according to the protocol currently proposed. The current protocol provided relevant insights about TH expression and irreversible locomotor impairment.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Parkinson's disease; MPTP; Intranigral; Animal model; Tyrosine hydroxylase

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder mainly characterized by motor deficits resulted by the decrease of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc). Most cases of the disease occur sporadically and the pathogenesis is still unclear. As of late several animal models have been developed to study the underlying mechanisms that lead to the development of experimental PD (Smeijne and Jackson-Lewis, 2005; von Bohlen and Halbach, 2005). The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) model

still constitutes the best-characterized toxin paradigm for PD, faithfully replicating most of its clinical and pathological hallmarks (Eberhardt and Schulz, 2003; Lima et al., 2007). MPTP was discovered in 1982, when a group of drug addicts developed sub-acute onset of severe parkinsonism caused by self-administration of a synthetic heroine analogue contaminated during manufacture (Langston et al., 1983; Ballard et al., 1985). MPTP is highly lipophilic and readily crosses the blood–brain barrier. Monoamine oxidase-B in glial cells converts MPTP to 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) (Chiba et al., 1984), which is taken up via the neuronal dopamine (DA) transporter and accumulates in dopaminergic neurons. After that, MPP⁺ is concentrated in mitochondria where it inhibits complex I reducing ATP generation and causing increased free-radical production (Beal, 2001).

* Corresponding author. Fax: +55 11 5572 5092.
E-mail addresses: angelareksidler@yahoo.com.br (A.B. Reksidler),
mmeirasantoslima@psicobio.epm.br (M.M.S. Lima).

We have shown in previous studies that the administration of MPTP directly into the SNpc of rats causes a partial loss of dopaminergic neurons, depletion of striatal (DA) and up-regulation of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 resulting in sensorial, memory and motor deficits with temporary impairment, modeling the early phase of PD (Braga et al., 2005; Da Cunha et al., 2001, 2002; Ferro et al., 2005; Lima et al., 2006; Miyoshi et al., 2002; Perry et al., 2005; Reksidler et al., 2007). Recently, a different protocol of MPTP-induced nigrostriatal lesion in rats was proposed, with the use of intranasal administration of MPTP (Prediger et al., 2006; Franco et al., 2007). Nevertheless, this PD model, like others, reproduces the early phase of the disease, which denies the possible existence of a synergic effect of consecutive insults to the dopaminergic neurons. We proposed a novel protocol of MPTP nigrostriatal lesion, which consists in repeated MPTP intranigral administrations to differentiate effects of a single lesion from effects of repeated lesions. Because there is cumulative nigrostriatal degeneration, similar to that observed during the development of the disease, we adopted a schedule of 3-day intervals between the MPTP administrations, totaling 3 infusions in 9 days. In order to obtain the needed data, we verified the extent of dopaminergic neuronal loss inflicted by MPTP by estimating the number of tyrosine hydroxylase immunoreactive (TH-ir) neurons within the SNpc. Additionally, motor system function was analyzed through the open-field test to verify locomotor activity alterations. Complementarily, western blotting analyses were performed for substantia nigra (SN) in order to verify the influences on tyrosine hydroxylase (TH) protein expression produced by the intranigral administrations of MPTP.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats from our colony weighing 280–320 g at the beginning of the experiments were used. One hundred and eighty rats were used to perform the behavioral tests, and these very same animals were used for the immunohistochemistry analyses. An additional set of 54 rats were used for Western blotting experiments. After the surgical procedure the animals were returned to the same home cages they were housed and maintained in a temperature-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) on a 12 h light–dark cycle (lights on 7:00 a.m.) with free access to food and water. The animals used in this study were maintained and handled in accordance with the guidelines of the Ethical Committee of Universidade Federal do Paraná (UFPR) and Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Brazil.

2.2. Experimental protocol

The animals ($n=78/\text{group}$) received bilateral guide cannula implants allowing for the introduction of an injection needle into the medial SNpc. After 7 days of recovery from the stereotaxic surgery, three intranigral MPTP administrations were performed according to a schedule as follows: 60 rats received the 1st infusion, 10 of which performed the open-field 1 day after the

infusion. Immediately afterwards those rats were transcardially perfused for brain fixation allowing for histological exam to determine the neuronal loss within the SNpc. The same procedure ($n=10$) was made 3 days after the 1st MPTP infusion. The 2nd and 3rd infusions were conducted under the same experimental protocol, which adopted two time-points of histological and behavioral analysis between the infusions with the use of different subjects at each time-point in order to avert the habituation phenomenon along the locomotor assessment. A control ($n=10$ for each time-point along the infusions) group was submitted to the same experimental design. Complementarily, the 54 remaining rats underwent the very same experimental protocol, but instead of locomotor assessment, those animals were decapitated at the time-points ($n=3$ for each time-point for each group) allowing for the study of TH protein expression in the SN.

2.3. Stereotaxic surgery and intranigral injections

The animals were distributed at random and equally into the following groups: control ($n=78$), sham ($n=78$) and MPTP ($n=78$). Rats were anesthetized with diazepam (10 mg/kg i.p.) and ketamine (90 mg/kg i.p.). All the groups, with the exception of the control, received a bilateral guide cannula implanted 2.0 mm above the SNpc according to the following coordinates: anteroposterior (AP): -5.0 mm from bregma; mediolateral (ML): ± 2.1 mm from midline; dorsoventral (DV): -7.8 mm from skull, adapted from Paxinos and Watson (2005). All the operated rats received penicillin G-procaine (20,000 U in 0.1 ml, i.m.) after surgery. After 7 days the animals were manipulated and immobilized in order to perform the drug injections. Each infusion was performed with a 30-gauge stainless injection needle bilaterally introduced through the cannula for the administration of 1 μL of MPTP (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, prepared in sterile saline 0.9%). The control of the flow of the injection was made by using an electronic pump (Insight Instruments, Ribeirão Preto, Brazil) at a rate of 0.40 $\mu\text{L}/\text{min}$ for 2.5 min, followed by 2 min with the needle in the injection site to avoid reflux. Sham operations followed the same procedure but using 1 μL of sterile saline 0.9%.

2.4. Locomotor assessment

In order to assess the locomotor deficit elicited by MPTP the open-field was performed 1 and 3 days after the first intranigral administration. Additionally, we performed the same procedure 1 and 3 days after the 2nd and the 3rd MPTP administrations. This method of motor activity evaluation has been validated in several reports that have referred to the use of dopaminergic agonists and antagonists (Del Arco et al., 2007; Perry et al., 2004; Queiroz et al., 2002; Zadicario et al., 2007). Locomotor assessment began by placing the rats in the same position of the open-field. During the experiments, the open-field was videotaped and the measures for ambulatory distance, velocity and ambulatory paths were computed online by an image analyzer (2020 Plus tracking System—HVS Image, UK). Rats were observed individually for 5 min and the different groups were

inter-mixed. The apparatus was cleaned with a water–ethanol (5%) solution before behavioral testing to eliminate possible bias due to odors left by previous rats.

2.5. TH immunohistochemistry

For the immunohistochemical study, the rats were deeply anesthetized with ketamine immediately after the behavioral test, and were intracardially perfused with saline first, then with 4% of the fixative solution formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). Brains were removed from the skulls and were immersed during 1 week in that fixative solution at 4 °C. Subsequently, the brains were placed in 30% sucrose solution for 48 h before sectioning. Four series of 30 µm thick sections were cut on a cryostat in the frontal plane and collected from the caudal diencephalon to the caudal midbrain. Tissue sections were incubated with primary antibody anti-TH, raised in rabbits, diluted in PBS containing 0.3% Triton X-100 (1:500; cat # AB152 Chemicon, CA, USA) overnight at 4 °C. Biotin conjugated secondary antibody incubation (1:200 cat # S-1000 Vector Laboratories, USA), was made for 2 h at room temperature. After several washes in PBS, antibody complex was localized using a variation of the ABC system (Vectastain ABC Elite kit cat # PK6101, Vector Laboratories, USA) followed by 3,3'-diaminobenzidine reaction with nickel enhancement. Slides were then dehydrated in ascending ethanol concentrations, cleared in xylene and coverslipped. An adjacent series was stained with cresyl violet to serve as a reference series for cytoarchitectural purposes. In order to estimate the extent of neuronal loss of the midbrain due to MPTP using stereological methods we first assessed the dopaminergic cell group in the SNpc in control and sham animals, which preserved a normal cytoarchitectural appearance and TH immunostaining. Subsequently, we compared those observations to the very same parts of the dopaminergic cell groups from the MPTP groups.

2.6. TH protein expression

To determine the expression profile of TH we used 54 rats distributed in the same groups and time-points mentioned previously: control ($n=3$), sham ($n=3$), and MPTP ($n=3$). Animals were killed at the time-points by decapitation and their brains were quickly dissected. The SN was immediately frozen in dry ice and stored at –80 °C until the lysis procedure was performed in a 1.5 mL eppendorf tube by sonication in presence of an ice-cold buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 250 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.25% sodium deoxycholate, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 20 µM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), and protease inhibitors (Complete tablet; Roche, Indianapolis, IN, USA). After incubation on ice for 30 min extracts were centrifuged at 12,000 × g for 40 min at 4 °C, and the supernatants for protein extracts were collected and stored at –80 °C for further Western blotting analysis. The aliquot of supernatant was collected for total protein analysis (Lowry et al., 1951). Samples containing equal amounts of total protein (5 µg per

lane) were boiled with SDS sample buffer and electrophoresed in 10% SDS-polyacrylamide gels in Mini Protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, USA). Proteins were electrophoretically transferred to PVDF membranes using a Mini transblot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad, USA). Each membrane was blocked for 1 h in 10% nonfat dry milk/0.5% Tween-20 in Tris-buffered saline. Subsequently, each PVDF membrane was probed overnight at 4 °C with mouse monoclonal antibodies against TH (1:5000; cat # T2928 Sigma, USA) or β -tubulin III (1:500; cat # MAB1637 Chemicon, USA) followed by several washes in TBST and incubation with an adequate secondary horseradish peroxidase-conjugated antibody (1:5 000; cat # 30021019 GE, USA) for 60 min, and visualized by chemiluminescence (cat # sc 2048 Santa Cruz Biotechnology, USA). The bands were quantified by using the software ImageJ 1.32j public domain (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.7. Statistical analysis

Differences in number of cell counts and Western blotting data underwent analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls test. The open-field data were concluded to be parametric by the Bartlett's test. Two-way ANOVA with repeated measurements was employed to detect differences between the administrations and different groups. For the behavioral data, the Tukey test was used as *post hoc* when indicated by ANOVA. Differences were considered significant if $P<0.05$. The values were expressed as mean \pm S.E.M.

3. Results

3.1. TH immunohistochemistry

Representative photomicrographs of TH immunohistochemistry in the SNpc, of each time-point, are shown in Fig. 1. The TH-ir neurons were prominently detectable in the SNpc of control and sham rats, respectively. The bodies and fibers of dopaminergic neurons showed intense staining with evident immunopositive processes. As depicted in Figs. 1 and 2 single and repeated intranigral administration of MPTP caused a similar marked loss of TH-ir SNpc neurons [$F(10.47)=17.25$; $P<0.01$], in comparison to control and sham groups. One day after the 1st MPTP infusion, a significant loss of TH-ir neurons ($P<0.01$; 53.85%) was detected, in comparison to control and sham groups. Likewise, 3 days after the 1st infusion a very similar neuronal loss ($P<0.01$; 55%) was found.

The same analysis was made 1 day after the 2nd infusion, which demonstrated the same pattern of neuronal loss ($P<0.01$; 52%) in the lesioned group in comparison to control and sham groups. Three days after the 2nd infusion revealed similar neuronal loss ($P<0.01$; 56%) to that observed at the previous time-points. Following the tested protocol, the two last time-points indicated the same amount of neuronal loss inflicted by MPTP ($P<0.01$; 54%) 1 day after the 3rd infusion and ($P<0.001$; 57%) 3 days after the 3rd infusion.

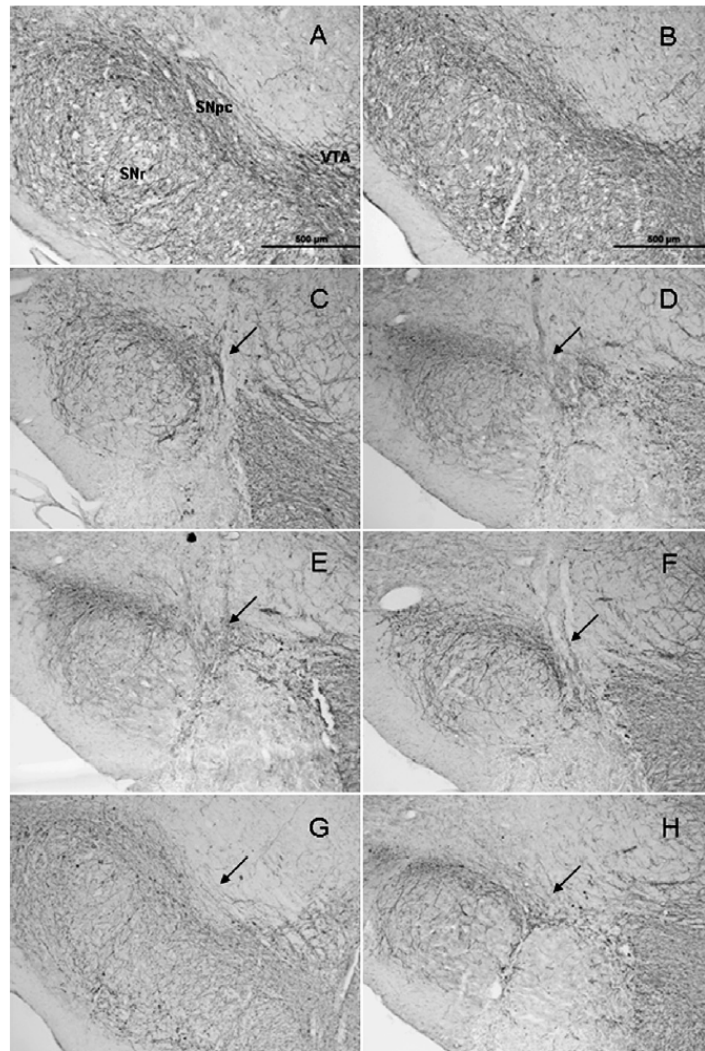


Fig. 1. Photomicrograph of representative sections of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons (TH-ir) in the substantia nigra of the following groups: (A) control; (B) sham; (C) MPTP 1 day after 1st infusion; (D) MPTP 3 days after 1st infusion; (E) 1 day after 2nd infusion; (F) 3 days after 2nd infusion; (G) 1 day after 3rd infusion; (H) 3 days after 3rd infusion. Legend: SNpc, substantia nigra pars compacta; SNr, substantia nigra reticular; VTA, ventral tegmental area. Arrows indicate lesion sites. Scale bar: 500 μm .

3.2. Locomotor assessment

The results from repeated intranigral MPTP infusions showed that there was a significant effect of MPTP in promoting impairment of locomotor parameters, such as locomotion distance and ambulatory velocity. The first time-point analyzed depicted in Table 1 and Fig. 3A (1 day after the 1st infusion) revealed a significant reduction in the locomotion distance [$F(2,25)=13.44$; $P<0.01$] traveled by the MPTP group in comparison to control

and sham groups. Similar to that, mean velocity of ambulation (Table 1 and Fig. 3B), in the MPTP group, presented a reduction [$F(2,24)=17.76$; $P<0.001$] in comparison to control and sham groups at the same time-point. These differences in locomotor behavior were also clearly observed through the representative locomotor paths of control, sham and MPTP (1 day after 1st infusion) groups, as depicted in Fig. 4A, B and C, respectively. In opposite to the initial locomotor deficit observed at the first time-point, a marked recovery of

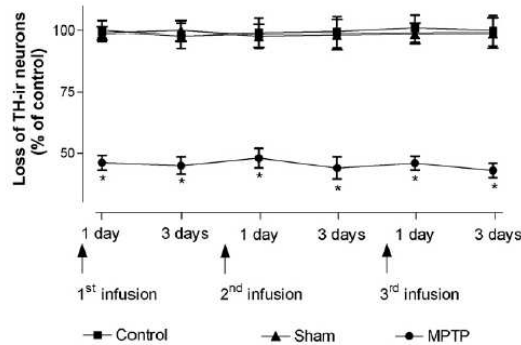


Fig. 2. Effects of repeated intranigral MPTP administration on the percentage of loss of tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons (TH-ir) in the substantia nigra pars compacta (SNpc) of rats. The values are expressed as mean \pm S.E.M. compared to the control group ($n = 10$ animals per group). * $P < 0.05$ compared to the control group; ANOVA followed by the Newman–Keuls test.

locomotion distance [$F(2.21) = 16.06$; $P < 0.05$] and ambulation velocity [$F(2.24) = 15.56$; $P < 0.05$] depicted in Table 1, Figs. 3A and B and 4D, respectively, was observed 3 days after the 1st infusion (second time-point).

Despite that recovery, the 2nd infusion yet again inflicted a drastic locomotor impairment in the MPTP group. Likewise, 1 day after the 2nd infusion (third time-point) locomotion distance was found to be reduced [$F(2.17) = 3.97$; $P < 0.05$] in compar-

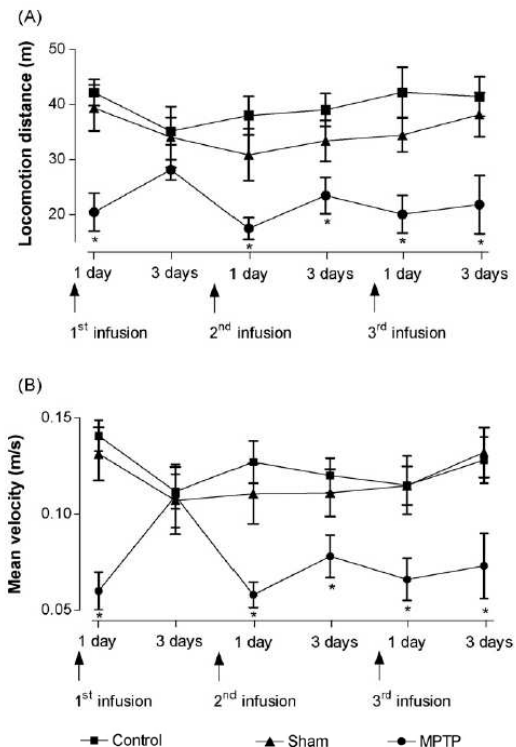


Fig. 3. Time-course effect of locomotion distance traveled (A) and mean velocity of ambulation (B) during the open-field test after repeated intranigral MPTP administration. The values are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ animals per group). * $P < 0.05$ compared to control group. ANOVA followed by the Tukey test.

Table 1

Effects of repeated intranigral MPTP administration in the locomotion distance traveled and mean velocity of ambulation during the open-field test

	Locomotion distance (m)	Mean velocity (m/s)
1 day after 1st infusion		
Control	42.18 \pm 2.39	0.14 \pm 0.008
Sham	39.35 \pm 4.16	0.13 \pm 0.013
MPTP	20.39 \pm 3.43*	0.06 \pm 0.009*
3 days after 1st infusion		
Control	35.14 \pm 2.48	0.11 \pm 0.009
Sham	34.68 \pm 5.54	0.10 \pm 0.017
MPTP	28.15 \pm 1.84	0.10 \pm 0.016
1 day after 2nd infusion		
Control	38.07 \pm 3.50	0.12 \pm 0.011
Sham	30.86 \pm 4.76	0.11 \pm 0.015
MPTP	17.44 \pm 1.97*	0.05 \pm 0.006*
3 days after 2nd infusion		
Control	39.32 \pm 2.98	0.12 \pm 0.009
Sham	33.40 \pm 3.70	0.11 \pm 0.012
MPTP	23.43 \pm 3.30*	0.078 \pm 0.011*
1 day after 3rd infusion		
Control	42.24 \pm 4.55	0.11 \pm 0.015
Sham	34.45 \pm 3.05	0.11 \pm 0.010
MPTP	20.01 \pm 3.41*	0.06 \pm 0.011*
3 days after 3rd infusion		
Control	41.46 \pm 3.60	0.12 \pm 0.012
Sham	38.17 \pm 4.00	0.13 \pm 0.013
MPTP	21.78 \pm 5.32*	0.07 \pm 0.017*

The values are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 10$ animals per group). * $P < 0.05$ compared to control group. ANOVA followed by the Tukey test.

ison to control and sham groups (Table 1, Figs. 3A and 4E). Similarly, mean velocity of ambulation (Table 1 and Fig. 3B) of the MPTP group presented a reduction [$F(2.19) = 4.63$; $P < 0.05$] in comparison to control and sham groups at the same time-point. Three days after the 2nd MPTP infusion (fourth time-point), the same degree of behavioral alterations was found in the groups tested. Locomotion distance (Table 1, Figs. 3A and 4F) was reduced [$F(2.20) = 3.04$; $P < 0.05$] in the MPTP group in comparison to control and sham groups. Likewise, ambulation velocity (Table 1 and Fig. 3B) was equally reduced [$F(2.21) = 3.55$; $P < 0.05$] in the MPTP group in comparison to control and sham groups. One day after the 3rd infusion (fifth time-point) locomotion distance was reduced [$F(2.18) = 4.35$; $P < 0.05$] in the MPTP group (Table 1, Figs. 3A and 4G) in comparison to control and sham groups. Likewise, ambulation velocity presented a significant reduction in the MPTP group [$F(2.18) = 4.36$; $P < 0.05$] (Table 1 and Fig. 3B) when compared to control and sham groups. Maintaining a constant locomotor deficit pattern, the MPTP group showed a significant reduction [$F(2.20) = 4.25$; $P < 0.05$] in the locomotion distance parameter 3 days after the 3rd infusion (sixth and last time-point recorded) (Table 1, Figs. 3A and 4H). Ambulation velocity

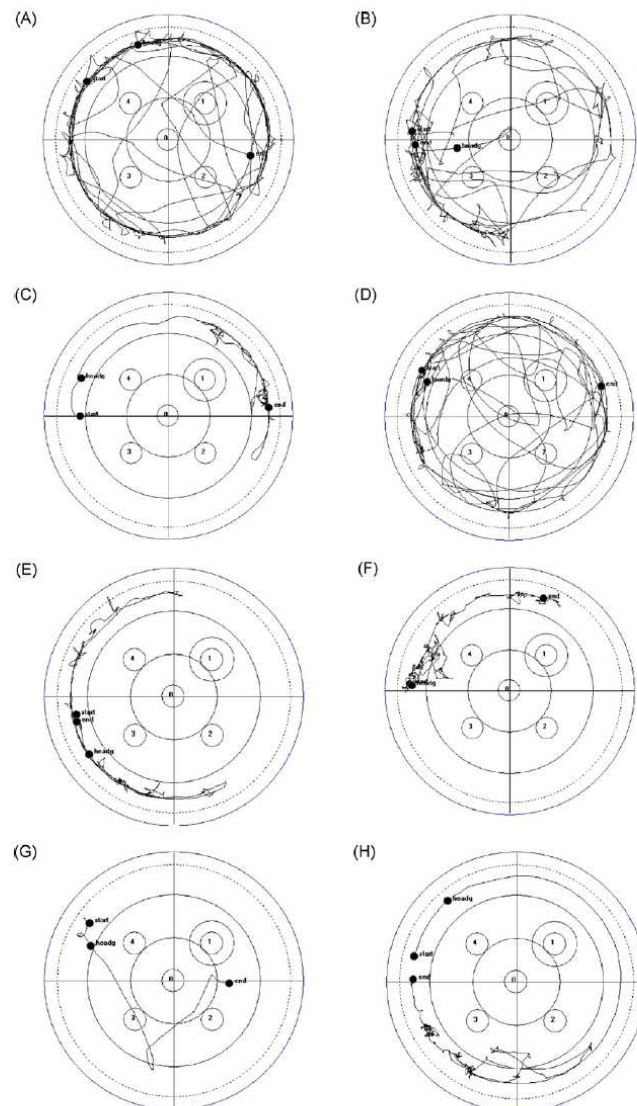


Fig. 4. Representative ambulatory trajectories of each group ((A) control; (B) sham; (C) MPTP 1 day after 1st infusion; (D) MPTP 3 days after 1st infusion; (E) 1 day after 2nd infusion; (F) 3 days after 2nd infusion; (G) 1 day after 3rd infusion; (H) 3 days after 3rd infusion) during the open-field test. The animals were left in the western portion of the open-field to recording. Black spots indicate start and end points of trajectories.

showed the very same profile, which was verified as a reduction of this parameter [$F(2,18)=4.62$; $P<0.05$], in the MPTP group in comparison to control and sham groups (Table 1 and Fig. 3B).

A full time-course analysis of the locomotion distance traveled and the ambulatory velocity was provided (Fig. 3A and B) in order to support the idea of a constant locomotor impair-

ment induced by the repeated MPTP infusions protocol, more specifically, after the 2nd infusion.

3.3. TH protein expression

Western blot analysis of the SN revealed a single band of molecular mass of 60 kDa in all groups. Densitometric analy-

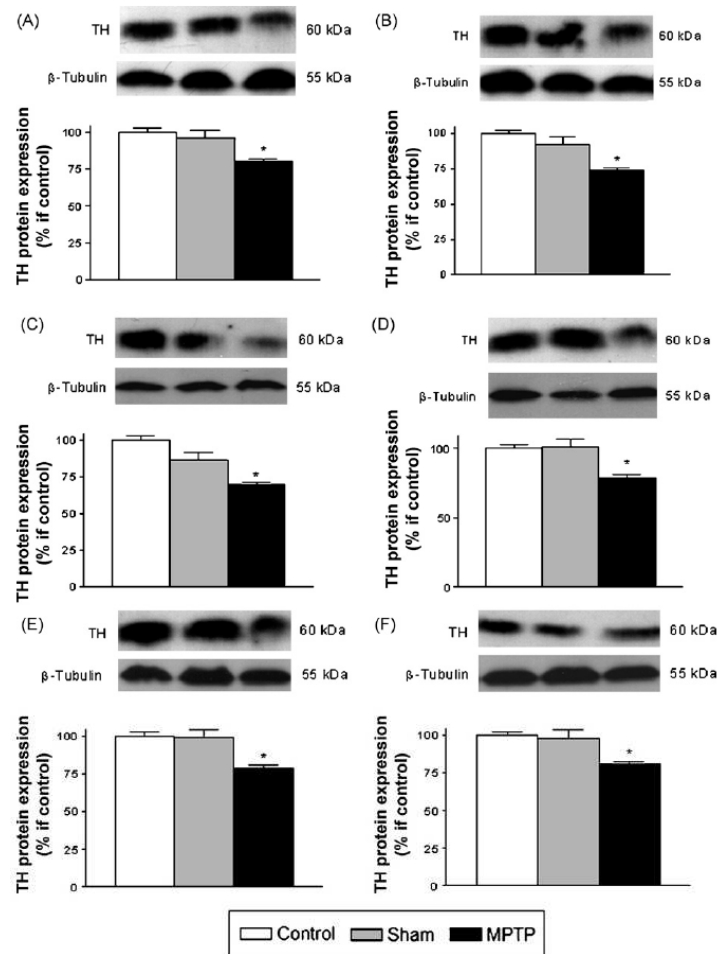


Fig. 5. Western blot analyses of TH protein expression in the substantia nigra of groups after repeated intranigral MPTP administration. A representative immunoblot is shown. (A) 1 day after 1st infusion; (B) 3 days after 1st infusion; (C) 1 day after 2nd infusion; (D) 3 days after 2nd infusion; (E) 1 day after 3rd infusion; (F) 3 days after 3rd infusion. The values are expressed as mean \pm S.E.M. ($n = 3$ animals per group). * $P < 0.05$ compared to the control group. ANOVA followed by the Newman-Keuls test.

ses showed that TH protein expression proved to be reduced [$F(9,73) = 17.16$; $P < 0.01$] immediately after the 1st intranigral MPTP administration in comparison to control and sham groups (Fig. 5A). Three days after the 1st administration (Fig. 5B) TH expression still presented the same amount of deficit ($P < 0.01$; 26%) compared to control and sham groups. One day after the 2nd intranigral MPTP administration (Fig. 5C) revealed a significant reduction ($P < 0.01$; 30%) of TH expression in comparison to control and sham groups. Similarly, 3 days after the 2nd infusion (Fig. 5D), TH remained at the same level of reduction ($P < 0.01$; 20%) when compared to control and sham groups. One day after the 3rd MPTP administration (Fig. 5E), the same pattern of TH expression ablation ($P < 0.01$; 21%) was observed

in comparison to control and sham groups. Finally, the last time-point analyzed, revealed that TH expression remained reduced ($P < 0.01$; 20%) 3 days after the 3rd MPTP intranigral administration (Fig. 5F).

4. Discussion

Acute and sub-chronic MPTP exposure in mice and in non-human primates results in loss of nigrostriatal dopaminergic neurons that is not progressive and may eventually recover over time (Eidelberg et al., 1986; Petroske et al., 2001). In this sense, an exposure paradigm has been developed using prolonged, chronic exposure to MPTP that produces both a

long-lasting and progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons (Meredith et al., 2002; Petroske et al., 2001). Because PD is both a chronic and progressive disorder, it is a desirable characteristic that animal models replicating the disease produce chronic and progressive loss of nigrostriatal dopaminergic neurons (Drolet et al., 2004). In the present study, we examined the dopaminergic perturbations, manifested as neuronal loss, locomotor deficit and reduction of TH protein expression, from a protocol, which adopted repeated intranigral MPTP administrations at different time intervals. Such intervals (3 days between MPTP infusions) were chosen considering the plasticity of the dopaminergic system in terms of recuperating the locomotor impairment inflicted by a single intranigral MPTP administration (Lima et al., 2006). Yet another model using a repeated administration protocol of a dopaminergic neurotoxin (MPP⁺) in rats was described by Yazdani et al. (2006), achieving a maximal of 65% of neuronal loss and also detection of Lewy-body-like-structures. This interesting approach consisted of a 28-day treatment of MPP⁺ infused systemically through a subcutaneously implanted minipump. Still, this report did not show evidence of motor disruption elicited by the model, even though the neurochemical and histological impairments were detected.

Our findings demonstrated that the dopaminergic neurons were markedly depleted in the SNpc immediately 1 day after the 1st MPTP administration until the last one. A constant pattern of dopaminergic TH-ir neuronal loss was found along the repeated neurotoxin infusions, indicating an absence of neurotoxic synergism or maybe cumulative MPTP effect. Differently from previous reports (Meredith et al., 2002; Petroske et al., 2001) which proposed 10 doses of systemic MPTP (25 mg/kg) administrations combined with probenecid (which inhibits the rapid clearance and excretion of MPTP from the kidney), we adopted a shorter schedule of treatment, with an intranigral delivery of significantly less neurotoxin quantities and without the use of a similar adjuvant. Besides, we emphasized that our protocol proved to be satisfactory in the production of reliable motor deficits, which in our perspective is fundamental as a PD model.

To evaluate the motor effects generated by the nigrostriatal lesions we resorted to examine the locomotion distance, mean velocity of locomotion and ambulatory paths in the open-field. The 1st MPTP infusion resulted in reduction of locomotion distance and in the mean velocity on the very 1st day after the 1st lesion time-point. In contrast, 3 days after the 1st infusion, the ambulatory parameters were restored. The 2nd and 3rd infusions led to an irreversible state of hypolocomotion. These results seem to suggest that dopaminergic neurons resident within the SNpc presented relative plasticity, which was able to compensate only the first severe neurotoxic assault (Lima et al., 2006; Reksidler et al., 2007). And those neurons, when consecutively damaged, dramatically reduced their compensatory ability resulting in permanent locomotor deficit, which could explain the behavioral results.

In this sense, to clarify the compensatory capacity of the remaining dopaminergic neurons, we assessed the TH protein expression in the SN, which plays a key role in delineat-

ing the locomotor mechanisms elicited by the dopaminergic system (Blandini et al., 2000; Ferraz et al., 2003). TH expression was found diminished since the first time-point after MPTP until the last time-point, 3 days after the 3rd infusion. The susceptibility of TH expression during MPTP exposure is an important feature of the model, which is probably not only dictated by the dopaminergic neuronal loss. Together, the data suggest that intrinsic disturbances involving the neuronal metabolism of MPTP/MPP⁺ may down-regulate TH expression to avoid a compensatory overproduction of DA which would lead to a potential augmentation of oxidative stress.

A hallmark feature of the intranigral MPTP model, using an individual infusion, is the temporary locomotor deficit, which was reverted to levels similar to those of controls 3 days after the administration, despite the prominent dopaminergic neuronal loss of about 52%. A possible explanation for this data lies in the participation of dopaminergic mesoaccumbens pathway in locomotor activity. It is thought that the nucleus accumbens with its dense dopaminergic innervation mediates the behavioral expression of a sensitized state, a key process underlying drug addiction (Bjijou et al., 2002). Although repeated intracerebral injections of amphetamine directly into the nucleus accumbens increase locomotor activity, it does not sensitize locomotion (Cador et al., 1995; Vezina, 1993). Additionally, emerging evidence has shed light on the influence the mesoaccumbens exerts on locomotion as a degree of dopaminergic tone seems to be necessary to express the full magnitude of locomotor activation (Sotnikova et al., 2005).

The current protocol proposed to generate a consistent and irreversible locomotor impairment, and probably a progressive neurodegeneration, compatible with the features of PD. In the light of neuronal loss, the present data suggest that repeated MPTP infusions did not produce a synergic or even cumulative neurotoxic effect on dopaminergic neurons. According to Fornai et al. (2005), continuous MPTP infusions caused less acute toxicity because the peak concentrations of MPP⁺ were lower, but produced chronic impairments in dopaminergic neurons of the SNpc and noradrenergic neurons of the locus coeruleus. Despite the absence of a progressive neuronal loss, locomotor impairments were clearly achieved throughout the repeated infusions, mainly after the second one, which subsequently produced an irreversible deficit in locomotion distance and ambulatory velocity. We suggest that locomotor impairment occurred not only in response to the reduction of dopaminergic neurons and consequent diminishing of dopaminergic afference to the striatum, but also occurred in the massive and constant ablation of TH protein expression, from the 1st infusion until the last time-point examined. This event is suggestive of an important effect of MPTP on this enzyme expression, one that permits the recreation of a disease state that mimics human PD better than the single infusion model.

In summary, the current results demonstrated that persistent locomotor deficit was produced without using chronic MPTP exposure. TH-ir neurons were reduced in 50% at the very first time-point (1 day after the 1st infusion) and the neuronal loss remained constant even after the 2nd and 3rd MPTP infusions. In

parallel, TH protein expression revealed to be a sensitive target for MPTP, once it was found to be down-regulated after MPTP infusions. Such event suggests that enzyme expression is instrumental for locomotor behavior, rather than merely the number of TH-ir neurons.

We speculate that the dopaminergic nigrostriatal neurons presented an important compensatory capacity, once those neurons did not exhibit a progressive neuronal death when MPTP was repeatedly administered. In this sense, our protocol failed to mimic human PD, but it did succeed in providing relevant insights about TH expression and irreversible locomotor impairment. The current protocol might be an attractive model for studying therapeutic approaches for PD, in the light of behavioral and TH expression deficits.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, CNPq, AFIP, FAPESP-CEPID (98/14.303-0 to ST). The authors would like to thank Mrs. Sílvia Gennari for her capable technical assistance. SMZ, RA, ST and MABFV are recipient of CNPq fellowships.

References

- Ballard PA, Tetud J, Langston JW. Permanent human parkinsonism due to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): seven cases. *Neurology* 1985;35:949–56.
- Beal MF. Experimental models of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:325–34.
- Bijou Y, De Deurwaerdere P, Spampinato U, Stinus L, Cador M. D-Amphetamine-induced behavioral sensitization: effect of lesioning dopaminergic terminals in the medial prefrontal cortex, the amygdala and the entorhinal cortex. *Neuroscience* 2002;109:499–516.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Neurobiology* 2000;62:63–88.
- Braga R, Kouzmine I, Canteras NS, Da Cunha C. Lesion of the substantia nigra pars compacta impairs delayed alternation in a Y-maze in rats. *Exp Neurol* 2005;192:134–41.
- Cador M, Bijou Y, Stinus L. Evidence of a complete independence of the neurobiological substrates for the induction and expression of behavioral sensitization to AMPH. *Neuroscience* 1995;65:385–95.
- Chiba K, Trevor A, Castagnoli Jr N. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:574–8.
- Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital MABF, Miyoshi E, Andreatini R, Silveira R, Takahashi R, Canteras NS. Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 2001;124:9–18.
- Da Cunha C, Angellucci MEM, Canteras NS, Wonnacott S, Takahashi RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:227–37.
- Del Arco A, Segovia G, Canales JJ, Garrido P, Blas M, García-Verdugo JM, Mora F. Environmental enrichment reduces the function of D1 dopamine receptors in the prefrontal cortex of the rat. *J Neural Transm* 2007;114:43–8.
- Drolet RE, Behrouz B, Lookingland KJ, Goudreau JL. Mice lacking α -synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology* 2004;25:761–9.
- Eberhardt O, Schulz JB. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic therapy in the MPTP model of Parkinson's disease. *Toxicol Lett* 2003;139:135–51.
- Eidelberg E, Brooks BA, Morgan WW, Walden JG, Kokemoor RH. Variability and functional recovery in the *N*-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of parkinsonism in monkeys. *Neuroscience* 1986;18:817–22.
- Ferraz AC, Xavier LL, Hernandez S, Sulzbach M, Viola GG, Anselmo-Franci JA, Achaval M, Da Cunha C. Failure of estrogen to protect the substantia nigra pars compacta of female rats from lesion induced by 6 hydroxydopamine. *Brain Res* 2003;986:200–5.
- Ferro MM, Bellissimo MI, Anselmo-Franci JA, Angellucci MEM, Canteras NS, Da Cunha C. Comparison of bilaterally 6-OHDA- and MPTP-lesioned rats as models of early phase of Parkinson's disease: histological, neurochemical, motor and memory alterations. *J Neurosci Methods* 2005;148:78–87.
- Fontana F, Schlüter OM, Lenzi P, Gesi M, Ruffoli RF, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Pontarelli F, Battaglia G, Pellegrini A, Nicoletti F, Ruggieri S, Paperelli A, Sudhof TC. Parkinson-like syndrome induced by continuous MPTP infusion: convergent roles of the ubiquitin-proteasome system and α -synuclein. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:3413–8.
- Franco J, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN, Farina M, Dafre AL. Antioxidant responses and lipid peroxidation following intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats: increased susceptibility of olfactory bulb. *Life Sci* 2007;80:1906–14.
- Langston JW, Ballard P, Tetud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983;219:979–80.
- Lima MMS, Reksidler AB, Zanata SM, Machado HB, Tufik S, Vital MABF. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res* 2006;1101:117–25.
- Lima MMS, Andersen ML, Reksidler AB, Vital MABF, Tufik S. The role of the substantia nigra pars compacta in regulating sleep patterns in rats. *PLoS ONE* 2007;2(6):e513.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin protein reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- Meredith GE, Totterdell S, Petroske E, Santa Cruz K, Callison Jr RC, Lau Y. Lysosomal malfunction accompanied alpha-synuclein aggregation in a progressive mouse model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2002;956:156–65.
- Miyoshi E, Wietzikoski S, Camplesse M, Silveira R, Takahashi RN, Da Cunha C. Impaired learning in a spatial working memory version and in a cued version of the water maze in rats with MPTP-induced nigral lesion. *Brain Res Bull* 2002;58:41–7.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 5th ed. San Diego: Academic Press; 2005.
- Perry JC, Vital MABF, Frussa-Filho R, Tufik S, Palermo-Neto J. Monosialoganglioside (GM1) attenuates the behavioural effects of longterm haloperidol administration in supersensitive rats. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:127–33.
- Perry JC, Hipólido DC, Tufik S, Martins RD, Da Cunha C, Andreatini R, Vital MABF. Intra-nigral MPTP lesion in rats: behavioral and autoradiography studies. *Exp Neurol* 2005;195:322–9.
- Petroske E, Meredith GE, Callen S, Totterdell S, Lau YS. Mouse model of parkinsonism: a comparison between subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. *Neuroscience* 2001;106:589–601.
- Prediger RDS, Batista LC, Medeiros R, Pandolfo P, Florio JC, Takahashi RN. The risk is in the air: intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2006;202:391–403.
- Queiroz CMT, Alcântara FB, Yagüe AML, Bibancos T, Frussa-Filho R. Acute buspirone abolishes the expression of behavioral dopaminergic supersensitivity in mice. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:237–42.
- Reksidler AB, Lima MMS, Zanata SM, Machado HB, Da Cunha C, Andreatini R, Tufik S, Vital MABF. The COX-2 inhibitor parecoxib produces neuroprotective effects in MPTP-lesioned rats. *Eur J Pharmacol* 2007;560:163–75.
- Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Mol Brain Res* 2005;134:57–66.
- Sotnikova TD, Beaulieu J-M, Barak LS, Wetsel WC, Caron MG, Gainetdinov RR. Dopamine-independent locomotor actions of amphetamines in a novel acute mouse model of Parkinson's disease. *PLoS Biol* 2005;3:e271.

- Vezina P. Amphetamine injected into the ventral tegmental area sensitizes the nucleus accumbens dopaminergic response to systemic amphetamine: an in vivo microdialysis study in the rat. *Brain Res* 1993;605:332–7.
- von Bohlen, Halbach O. Animal models of Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 2005;2:313–20.
- Yazdani U, German DC, Liang C-L, Manzano L, Sonsalla PK, Zeevalk GD. Rat model of Parkinson's disease: chronic central delivery of 1-methyl-4-phenyl-pyridinium (MPP⁺). *Exp Neurol* 2006;200:172–83.
- Zadicario P, Ronen S, Eilam D. Modulation of quinpirole-induced compulsive-like behavior in rats by environmental changes: implications for OCD rituals and for exploration and navigation. *BMC Neurosci* 2007;8:23.